FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 7

La valeur globulaire et les anémies expérimentales *chez le Rat*

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de Marseille
Le 25 Juin 1960
par

Christine ARTAUD
née le 24 Janvier 1935 à MARSEILLE

Diplômée de Sérologie Certifiée d'Hématologie et d'Immunohématologie

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse :
M. Le Professeur **DUMAZERT** Président,
MM. Les Professeurs **PELLISSIER**, **MOURGUE**, **GREBUS**. — **Assesseurs**

LINO-IMP., BOULEVARD DESPLACES - MARSEILLE

1960

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547027_0043

Christine ARTAUD

Diplômée de Sérologie
Certifiée d'Hématologie et d'Immunohématologie

La valeur globulaire et les anémies expérimentales chez le rat

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : G. MORIN — Assesseur : J. DELPHAUT

Secrétaire Principal : P. MOUCHET — Bibliothécaire : Mlle PERRIN

Secrétaire Principal honoraire : J. COMTE

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs honoraires : MM. AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, JOYEUX, MOIROUD, MONGES, RIMATTEI, ROCHE, CHAUVIN.

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie appliquée et de Chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique	ARNOUX
Chimie Médicale	DERRIEN
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	LAMY
Clinique Chirurgicale	DE VERNEJOUL
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique	SALMON
Clinique de Chirurgie Thoracique	DOR
Clinique d'Endocrinologie	VAGUE
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	CREMIEUX
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER
Clinique des Maladies des Voies digestives et de la Nutrition	RECORDIER
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	APPAIX
Clinique de stomatologie	MARONNEAUD
Clinique d'Urologie	N...
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Sociale	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine expérimentale	DONNET
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	LENA
Pathologie interne	AUDIER
Pharmacologie	MERCIER F.
Pharmacie chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physiopathologie des voies respiratoires	LAVAL
Physique médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI

R. UNIV BIBLIOTHEEK

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. ROUX
M. MOURGUE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. BERNARD P.
BOURRET
CORRIOL
CRISTAUX
DEPIEDS
DESANTI
GAMBARELLI
GEVAUDAN
GREBUS
LISSITZKY
MERCIER J.
PASTOR
PAYAN
STAHL
TAMALET

AGREGES EN EXERCICE

MM. BERARD
BERNARD R.
BONNAL
CHARPIN
CHAUVIN
COMITI
DALMAS
DEVIN
FARNARIER
GERARD
LEGRE
MOUREN
ORSINI
REBOUD
SARLES
SERMENT
SIMONIN
TEMIME
TRIFAUD

AGREGES LIBRES

MM. BERTHIER
FIGARELLA
GRANJON
IMBERT
MONGES H.
OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI
RAYBAUD

Chargé des fonctions de Maître de conférence

Physiologie ..... M. ZWIRN

Chargés des fonctions d'Agrégé

Clinique des Maladies du Système Nerveux ... M. BOUDOURESQUE
Clinique de Stomatologie ..... M. LACHARD
Médecine Légale ..... M. GRAS

A MES PARENTS,

A MA MARRAINE,

A MES AMIS,

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur C. DUMAZERT

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse, après avoir guidé nos recherches avec bienveillance, pendant de nombreuses années.

Nous nous permettons de lui exprimer nos sentiments de gratitude et de profonde admiration.

A NOTRE JURY DE THESE,

A Monsieur le Professeur PELLISSIER,

qui a bien voulu accepter de siéger dans notre Jury de Thèse.

Nous l'en remercions très sincèrement.

A Monsieur le Professeur MOURGUE,

qui nous a fait l'honneur de bien vouloir juger notre travail.

Qu'il soit assuré de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Agrégé GREBUS,

auprès de qui nous avons trouvé l'accueil le plus aimable et qui a bien voulu s'intéresser à notre travail en acceptant de le juger.

Nous l'en remercions respectueusement.

A Monsieur le Docteur Louis ARTAUD,
Chirurgien des Hôpitaux

Très affectueusement.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

A Monsieur Claude GHIGLIONE,
Chargé de cours
Assistant de Chimie

qui nous apporta aide et conseils dans la réalisation de cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici, avec nos sincères remerciements, l'assurance de notre profonde sympathie.

A mes Camarades du Laboratoire de Chimie.

INTRODUCTION

Nous nous sommes proposés de doser l'hémoglobine dans le sang de rat, afin d'observer les variations de ce chromoprotéide au cours des anémies expérimentales.

Pour cela il faut choisir une méthode qui soit :

1° précise et sensible,

2° facile à mettre en œuvre pour effectuer des dosages en série,

3° réalisable sur une quantité minimum de sang, afin de pouvoir être répétée sur les animaux.

Assez brièvement, nous allons passer en revue les principales techniques en suivant le plan ci-dessous :

I. - Méthodes **chromoscopiques**

II. - Méthodes **colorimétriques** et **spectrophotométriques**

III. - Méthodes **spectroscopiques**

IV. - Méthodes **gazométriques**

V. - Méthodes **chimiques basées sur le dosage du fer.**

Nous verrons, en terminant cette introduction, qu'il convient de discuter de la valeur de ces méthodes lorsqu'on cherche à les appliquer au sang de sujets anémiés.

I. - METHODES CHROMOSCOPIQUES

Leur principe est la comparaison de la teinte du sang à des échelles colorées artificielles :

1° soit en déposant le sang sur papier et en le comparant à des échelles étalons ;

2° soit en recueillant le sang dans un tube gradué et en ajoutant une certaine quantité d'eau distillée jusqu'à l'obtention de la même teinte que celle d'un étalon fixe contenu dans un tube identique.

Parmi le **premier groupe** de ces méthodes, on peut citer : la technique de WELCKER (201). La gamme colorée est obtenue sur du papier blanc absorbant, par différentes dilutions d'un sang normal ; dans les mêmes conditions on compare une dilution du sang à analyser.

Celle de HAYEM (75) : une échelle peinte forme la gamme.

Celle de QUINCKE (149) reprise par HALLION et BORRIEN (71) : des solutions ammoniacales d'acide picrique et de carmin constituent la gamme.

Enfin celle de TALLQUIST (178-179) : le sang pur est directement comparé à une échelle peinte. Cela permet un dosage très simple.

Dans le **deuxième groupe** on peut signaler la technique de HOPPE - SEYLER (80) : l'étalon est une solution titrée d'oxyhémoglobine cristallisée.

Celle de GOWERS : l'étalon est une solution glycérinée de picrocarmin et d'ammoniaque. Celle de SAHLI qui utilise un composé plus stable que l'oxyhémoglobine : l'hématine acide. Le sang étudié est dilué dans une solution faible d'acide chlorhydrique, ceci transforme l'oxyhémoglobine en hématine.

Celle de ROSTOSKI et CRECELIUS (156) : l'étalon est un ruban de gélatine imprégné de chlorhydrate d'hématine.

Celle de PHILIPSEN (140-141) qui compare la couleur du sang hémolysé et réduit avec un étalon coloré, ou celle du sang non dilué mais hémolysé en présence de saponine. C'est en faisant varier l'épaisseur du récipient contenant l'échantillon à analyser

et formé d'un tube capillaire qu'il obtient la même coloration que celle de l'étalon. L'hémoglobinomètre de SAHLI est perfectionné par HADEN (67).

Selon KOZIRO MATUDA (95), pour obtenir des résultats comparables dans la détermination de l'hématine acide, les lectures colorimétriques doivent être effectuées après avoir laissé les solutions quinze minutes à 60°. MESINEV (111) construit une table basée sur la durée du traitement du sang avec l'acide chlorhydrique ; cela permet de procéder aux corrections nécessaires.

Enfin, BELL et Mc NAUGHT (18) suppriment l'influence de la température dans la méthode de SAHLI en se rapportant à un tableau.

L'avantage de ces méthodes réside dans le fait qu'elles sont très simples donc pratiques à utiliser.

Mais leurs défauts importants méritent d'être observés :

La sensibilité est très limitée ; les erreurs relatives sont respectivement de l'ordre de 11,4 % et 5 % pour le premier et le deuxième groupe. Les résultats sont spécialement anormaux quand le nombre de globules rouges tombe au-dessous de 4 millions, et dans les cas d'hyperbilirubinémie d'après MIMURO (113).

De plus, la précision est assez faible car les échelles et les étalons sont instables. Une certaine altération dans le temps ne manque pas de se produire.

Les défauts sont donc nettement supérieurs aux avantages de ces méthodes chromoscopiques.

II. - METHODES COLORIMETRIQUES ET SPECTROPHOTOMETRIQUES

Elles sont basées sur les lois relatives au phénomène de l'absorption des radiations lumineuses par les milieux colorés transparents. L'hémoglobine est un pigment coloré qui suit la loi de BEER-LAMBERT.

Les méthodes **colorimétriques ou photométriques** utilisent la totalité du spectre visible comme faisceau lumineux ou encore une bande plus ou moins étroite du spectre. Ceci grâce à des filtres colorés en verre ou gélatine intercalés sur le trajet du faisceau lumineux.

Au début l'hémoglobine est dosée à l'état d'oxyhémoglobine : le sang à étudier est dilué au 1/100e dans l'eau distillée. Il existe diverses méthodes.

Celle utilisant comme étalon une solution titrée d'oxyhémoglobine cristallisée dans un colorimètre de DUBOSQ.

Celle de PALMER (133) : l'étalon et le sang à étudier sont transformés en carboxyhémoglobine. Le sang est sous forme d'hématine acide ou de cyanohémoglobine et l'étalon une solution titrée de ces mêmes composés dans les méthodes de COHEN et SMITH (38), STADIE (175) modifiées par WU (207).

Le sang, mis en contact avec de l'hyposulfite de soude, est comparé avec un étalon dans « l'hémoglobinomètre » de BURKER (31).

MIMURO (113) propose de centrifuger et laver les globules rouges, puis d'effectuer la détermination colorimétrique de l'hématine acide formée.

ASHFORD (12) perfectionne la technique en plongeant les tubes munis d'un condensateur dans un bain à 40°-45° pendant 10 à 15 minutes et en les refroidissant ensuite rapidement. Ceci développe la coloration totalement, comme un séjour de deux heures à 14°-18°.

Une mesure très simple, mise au point par STOVALL (177), modifiée par GIORDANO (61), consiste à prélever 0,05 ml. de sang capillaire dans un tube spécial contenant 10 ml. de carbonate de soude à 0,1 %. On laisse 5 minutes et on effectue une lecture au photomètre.

HAVEMANN, JUNG et VON ISSEKUTZ (73) déterminent l'hémoglobine après sa transformation en méthémoglobine. Or toute l'hémoglobine n'est pas transformable en méthémoglobine. Récemment HAVEMANN et MAHLING (74) proposent une détermination colorimétrique sous forme de cyanométhémoglobine à pH 7, avec une précision de + ou — 0,6 %.

SACERDOTE (160) utilise un photomètre à cellule photoélectrique quand l'hémoglobine est contenue dans une solution très diluée : l'oxydation de la benzidine en présence de perhydrol est rendue plus sensible par l'emploi d'un tel photomètre. De même le sang doit être dilué pour déterminer le coefficient d'extinction d'une solution de carboxyhémoglobine. Il faut donc se placer dans des conditions optima avant d'effectuer ces mesures. D'après ANDES et NORTHUP (1) le sang doit être dilué au 1/400°. Et, Mac LAIN et PASTORIUS (103) expérimentent l'hémoglobinomètre photoélectrique, avec des solutions d'hématine acide. Un nouvel appareil « l'absorptiomètre photoélectrique » permet à PETERSON et STRANGEWAYS (139) d'estimer l'hémoglobinémie.

Un colorimètre ordinaire éclairé par une lumière monochromatique à la même longueur d'onde que celle absorbée par la solution à examiner : la raie verte du mercure à 545 mμ est mis au point par DOGNON (43-44) ; ce procédé, modifié par l'emploi d'un colorimètre de DUBOSQ et par la filtration ou la centrifugation des solutions d'hémoglobine, permet d'obtenir de meilleurs résultats.

BENIGNI (21) cherche à atténuer les erreurs dues aux étalons. Il prépare un étalon dans un solvant miscible avec le liquide à tester. Il mélange d'une part le sang et l'étalon, de l'autre le sang et le solvant. La composition des deux liquides étant la même, ceci conduit à une meilleure comparaison des couleurs.

D'après BELL, CHAMBERS et WADDELL (17) l'oxyhémoglobine stabilisée par de l'ammoniaque 0,007 N est préférable pour les déterminations photoélectriques courantes. Selon ce principe, une très rapide et simple méthode d'estimation en tant qu'oxyhémoglobine (le solvant renferme 1 % d'ammoniaque dans l'eau distillée) due à WELCH et WALTHER (200) dans le E.E.L. test tube colorimètre. Ces dernières années BARER et GAFFNEY (15) emploient de l'alcali dilué.

PIETTE (144) donne un autre procédé rapide : le sang est hémolysé avec une solution aqueuse de saponine ; ceci pendant trente minutes, puis il est centrifugé pour éliminer les stromas avant d'effectuer la lecture.

KING et GILCHRIST (90) déterminent, par colorimétrie, la couleur rouge de la cyanohématine obtenue en traitant le sang avec une solution de cyanure de sodium, soit par une macrométhode ou une microméthode.

Un procédé nouveau de WHITE, DELORY, CHRISTIE et DUDLEY (202). Ils ajoutent de la nicotinamide à une solution de sang dans la soude. Le mélange est réduit avec du dithionite de sodium ; ceci forme un hémochromogène avec deux bandes d'absorption bien marquées. Le coefficient d'extinction de l'hémochromogène nicotinamide ainsi formé est déterminé par une macrométhode ou une microméthode selon les exigences analytiques.

De nombreux auteurs se sont intéressés aux problèmes posés par le choix d'un étalon. Nous ne citerons que CANNAN (32-33-34-35-36) dont les travaux sont récents. Il propose un étalon sous forme de cyanométhémoglobine stable pendant neuf mois.

Enfin quelques microdéterminations colorimétriques sont basées sur l'activité peroxydasique de l'hémoglobine (208). BARNETT (16) transforme la couleur réduite d'un indicateur (2,6 dichlorophénolindophénol) en présence de sang et d'eau oxygénée. Une coloration rouge se produit et permet une microdétermination de l'hémoglobine. GARCIA - BLANCO et GRISOLIA (58) développent une couleur bleue en 7 à 8 minutes par l'activité pseudoperoxydasique de l'hémochromogène pyridine, par l'oxydation catalytique de la benzidine. ARDRY et STORCK (3-4) font réagir l'hémoglobine en présence d'eau oxygénée sur une solution de résorcine dans la pyridine : cela donne une coloration bleue. Cette méthode permet de doser l'hémoglobine pour une quantité de ce chromoprotéide de 200 mg. par litre (2,5 à 100 µg d'hémoglobine dans la prise d'essai) et est appliquée par les auteurs au dosage de l'hémoglobine dans le plasma et le sérum.

Quelques méthodes utilisent non plus des solutions étalons mais des verres étalonnés empiriquement. On peut citer les techniques de JOLYET et LAFFONT (84), de MALASSEZ (104-105) : le verre coloré est prismatique, donc intervient sous une épaisseur variable ; celle de FLEISCHL - MIESCHER et NEWCOMER (125) : l'hémoglobine est dosée à l'état d'hématine alcaline (solution de carbonate de soude à 1 pour mille) et d'hématine acide.

KENNEDY (87) propose une méthode dite « révolutionnaire » reprise par DUFFIE (49-50). Un instrument permet d'appliquer le principe que le vert est absorbé par une solution rouge. Si on a un vert pratiquement monochromatique, la quantité de cette lumière passant à travers la solution rouge d'hémoglobine sert à mesurer la quantité de cette dernière. L'appareil est un colorimètre à une cuve sans plongeur, dans laquelle la solution est observée verticalement à travers la moitié du champ. Sur l'autre moitié, un coin optique est interposé. On compare des luminosités et non des couleurs.

Les méthodes colorimétriques ou photométriques présentent l'avantage d'être utilisables dans la pratique clinique courante.

Cependant, quelques inconvénients gênent les dosages précis dans le domaine de la recherche :

1° Les conditions de validité des lois de l'absorption ne sont pas absolument respectées puisque la lumière incidente n'est pas monochromatique ;

2° La présence de pigments secondaires en quantités anormales conduit à des erreurs : ces techniques dosent, avec l'hémoglobine, les autres formes de pigments colorés présents dans le sang. Donc, dans les cas anormaux, la précision de ces dosages se trouve diminuée ;

3° Enfin un étalonnage préalable est indispensable. Les solutions d'hémoglobine et d'oxyhémoglobine ne présentent pas exactement les mêmes propriétés qu'à l'état normal dans le sang, de plus elles sont peu fidèles à cause de leur altération rapide.

Les dosages sous forme de dérivés de transformation de l'hémoglobine, plus faciles à obtenir sous forme d'étalons, sont alors moins spécifiques.

Les verres étalonnés empiriquement conduisent à des erreurs relatives importantes.

Le seul étalonnage valable consiste à déterminer, sur le même échantillon de sang, la teneur en hémoglobine par une autre technique de dosage très précise : gazométrique ou ferrimétrique.

Nous nous sommes alors proposés d'étudier les techniques nous paraissant les plus intéressantes et les plus significatives des possibilités permises par l'analyse spectrophotométrique.

Les méthodes spectrophotométriques se rapprochent des

conditions idéales exigées par la loi de BEER-LAMBERT. Les appareils utilisés donnent des bandes très étroites (jusqu'à 1 mμ) grâce à la présence de monochromateurs : ce sont des systèmes dispersifs à prisme ou réseau et des systèmes sélectifs à fente.

Initialement les dosages portent sur l'oxyhémoglobine en faisant des dilutions de sang de l'ordre de 1/175e ; on utilise une longueur d'onde entre 577 et 589 mμ considérée comme la plus forte bande d'absorption du spectre de l'oxyhémoglobine. On note les dosages effectués par VIERORDT (193), BRANLY (27), de SAINT-MARTIN (161), WILLIAMSON (203)... WEISE (199) mesure avec un colorimètre pourvu d'un monochromateur et d'un appareil faisant varier l'intensité de la lumière, l'hémoglobine réduite et l'oxyhémoglobine. Mais cette dernière ne peut être directement comparée avec les valeurs observées avec les solutions pures. De même JONXIS (85) base sa technique sur la différence d'absorption de la lumière violette à 536 mμ par l'hémoglobine et l'oxyhémoglobine. L'hémoglobine absorbe trois fois plus de lumière à 536 mμ que ne le fait l'oxyhémoglobine et l'absorption est proportionnelle à la concentration de ces pigments. Selon ce principe (72) ISSEKUTZ (83) détermine l'oxygène contenu dans le sang. RODRIGO (155) et ZIJLSTRA (211) pour arriver à la même connaissance, emploient la lumière réfléchie par ces solutions dans un hémoréflecteur.

DRABKIN (47-48), en se référant au fer, établit de précises constantes spectrophotométriques des hemochromogènes et plus récemment KING et COLL (46).

Puis des techniques basées sur les dérivés de transformations de l'hémoglobine sont mises au point. HEILMEYER (76), par simple mesure spectrophotométrique de l'hématine, obtient une précision de + ou — 11 %. Ceci est loin de la précision requise pour les dosages précis dans le domaine de la recherche.

L'absorption de l'hématine acide est déterminée à 372,5 mμ par KHALIFA et SALAH (88), ceci avec une précision semblable à celle de la technique ferrimétrique de WONG.

TURNER (181) met le sang au contact d'une solution de ferricyanure de potassium et cyanure de potassium, puis effectue la lecture à 545 mμ avec une précision de 2 % par rapport à la méthode de VAN SLYKE.

COHEN et BARNARD (37) abandonnent à la température de la pièce, pendant quinze minutes environ, une pipette ayant permis la numération des globules rouges ; ainsi la ferrohémoglobine est transformée en ferrihémoglobine. Puis, dans une cuve, le liquide est mis en contact de quelques cristaux de cyanure de sodium. Après cinq minutes, la lecture est faite à 540 mμ ; on compare avec un graphique préparé avec une solution étalon d'hémoglobine.

BETKE et SAVELSBERG (24) forment aussi de la cyanmé-

thémoglobine par l'action de ferricyanure et cyanure de potassium.

L'hypochlorite transforme directement l'hémoglobine en méthémoglobine et le coefficient d'extinction est déterminé à 628 mμ par KORANSKY (93). Signalons, avant de l'étudier en détail, la méthode microcolorimétrique de VERMEULEN (190), qui consiste à oxyder l'hémoglobine en méthémoglobine au moyen du ferricyanure de potassium et à former ainsi un dérivé stable dont on effectue la lecture spectrophotométrique à 500 mμ.

Parmi les techniques plus récentes, celle de NAHAS (118-119), réalisée dans un spectrophotomètre de BECKMAN DU. La prise d'essai, égale à 0,3 ml. de sang hémolysé par une solution de saponine, est placée dans une cuve spéciale qui permet une mesure anaérobie après que l'échange entre l'air ambiant et les pigments du sang se soit produit. Pour ces mesures spectrophotométriques, NAHAS (120) imagine une cuve simplifiée.

Les lectures spectrophotométriques sont effectuées aux différentes longueurs d'ondes spécifiques de l'absorption de l'hémoglobine et de l'oxyhémoglobine dans le visible et le proche infra rouge. Elles permettent une rapide connaissance de la concentration et de la saturation en oxygène de l'hémoglobine du sang à ANTEZAK (2), PIIPER (145), REFSUM (153). BRUCKNER (28), étudie l'absorption de l'oxyhémoglobine à 920 mμ et celle de l'hémoglobine par réduction du sang avec l'hyposulfite de soude ; le maximum d'absorption se situe à 755 et 900 mμ.

BRUCKNER et DESMOND (29), GIUBILEO (62) appliquent cette investigation dans une région définie du spectre pour estimer la carboxyhémoglobine dans le sang. KIMURA (89), selon ce principe, étudie quelques dérivés de transformation de l'hémoglobine. De même, POPOV et SOBCHUK (147) diluent le sang au 1/400e dans l'acide chlorhydrique 0,1 N. L'absorption de l'hématine acide formée est recherchée à une longueur d'onde λ = 430 mμ.

D'autre part, dans le spectre de Soret, à une longueur d'onde λ = 417 mμ, au moyen d'un spectrophotomètre photoélectrique, l'oxyhémoglobine est déterminée, même dans des dilutions élevées de sang. Ceci d'après GLADISHEVS'KA, KVYATKIVS''KA et SOBCHUK (63).

En conclusion, nous voyons que les inconvénients présentés par les dosages photométriques ne se retrouvent pas dans les techniques spectrophotométriques.

Leur principe répond aux conditions exigées par la loi limite de BEER-LAMBERT : la lumière monochromatique rend valable le principe d'additivité des densités optiques.

Seuls les pigments présents pour la longueur d'onde à laquelle s'effectue la mesure interviennent dans le coefficient d'absorption spécifique.

En théorie, un étalonnage préalable n'est pas nécessaire. Mais, en pratique, il est utile de contrôler la fidélité et la précision des mesures ainsi que la valeur des coefficients d'absorption spécifiques des pigments présents. Nous avons noté les difficultés inhérentes à ces étalonnages.

Les techniques plus récentes effectuées dans l'infra-rouge présentent une plus grande perfection. Mais ces appareils ne sont pas encore très répandus.

Cependant ces techniques spectrophotométriques présentent un intérêt certain et méritent d'être retenues.

Notre étude s'est ensuite poursuivie avec les méthodes spectroscopiques.

III. - METHODES SPECTROSCOPIQUES

Elles sont basées sur les propriétés du spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.

Trois méthodes peuvent d'abord être signalées : celle de HENOCQUE (77) est la plus simple. Dans des conditions précises on recherche l'épaisseur sous laquelle le sang donne le spectre de l'oxyhémoglobine avec les deux bandes d'absorption et la bande intermédiaire égales. Une table empirique permet de déduire l'hémoglobinémie recherchée. Cette méthode nécessite une intensité lumineuse définie.

Celle de PREYER (148) qui poursuit une dilution du sang dans l'eau distillée jusqu'à l'apparition dans le spectre de quelques radiations vertes. On note la dilution et on opère de même avec une solution-étalon d'oxyhémoglobine.

Celle de LESSER (101) qui obtient des bandes d'absorption de même largeur avec une dilution du sang de même qu'avec la solution-étalon.

On note peu de techniques nouvelles. HALL (70), recherche le taux d'hémoglobine au moyen d'un spectro-comparateur. La méthode est limitée au-dessus d'un pourcentage égal à 80 % et en-dessous de 20 %. La réaction de l'hémoglobine-chlorate est utilisée par REITER (154). Si l'hémoglobine est traitée par du chlorate de potassium, dans certaines conditions de pH, elle donne un brillant dans la région bleue du spectre, il disparaît après trois minutes. Ce brillant reste constant en présence de chlore, brome ou iode.

MEYER-WILMES et REMMER (112) déterminent par spectroscopie le pourcentage d'extinction du composé obtenu après contact du sang avec du cyanure de potassium. Le sang ayant été hémolysé dans certaines conditions de pH.

Ces méthodes spectroscopiques, si elles présentent une facilité

et une rapidité d'exécution, possèdent cependant peu d'intérêt. Des causes d'erreurs : soit l'apparition du vert dans un spectre, ou la formation de bandes d'absorption dont les bords sont toujours confus, ou la nécessité de préparer des solutions étalons (préparation délicate comme nous l'avons vu précédemment), diminuent la précision de ces techniques.

Nous avons recherché alors la valeur présentée par les méthodes gazométriques.

IV. - METHODES GAZOMETRIQUES

Dans des conditions convenables telles qu'une simple aération, l'hémoglobine est transformée en oxyhémoglobine. Sous l'action du vide et parfois d'un réducteur cette oxyhémoglobine est dissociée, l'oxygène est libéré et dosé. Sachant qu'une molécule d'oxygène correspond à un atome de fer, il ne reste plus qu'à déduire de cette mesure l'hémoglobinémie.

De la même façon on peut former de la carboxyhémoglobine et la dissocier ultérieurement pour doser l'oxyde de carbone.

Ces méthodes déterminent donc la quantité d'oxygène ou d'oxyde de carbone susceptible de se combiner à l'hémoglobine.

Parmi les méthodes plus anciennes, nous citerons celles de GREHANT (64), SCHUTZEMBERGER et RISSLER (170), de HALDANE (68) et NICLOUX (126). Leur manque de pratique, comme une prise d'essai trop importante de l'ordre de 20 à 30 ml. de sang, suffit à les abandonner.

Plus récemment, la technique de HALDANE (69) est modifiée. D'autre part, les appareils « volumétriques » et « manométriques » de VAN SLYKE (183-184-185) ont permis les techniques de LUNDSGAARD et MOLLER (102), VAN SLYKE et NEILL (188), VAN SLYKE et HILLER (186-187). La prise d'essai est très réduite : 0,2 à 2 ml. de sang, la précision atteint 0,25 %, il semble que la perfection soit obtenue. Avant d'étudier la valeur de ces procédés, notons quelques techniques particulières de ces 25 dernières années.

Une détermination « volumétrique » de RUSZNYAK et HATZ (159). Le sang est mis en contact d'une quantité connue d'oxyde de carbone. L'excès de ce corps non fixé par l'hémoglobine est titré : il est entraîné par un courant d'azote dans une solution de chlorure de paladium $PdCl_2 + CO \longrightarrow Pd + COCl_2$. Ce paladium en contact avec une solution-étalon de bromate de potassium forme du bromure de paladium. L'excès de bromate est déterminé par une solution d'arseniate de sodium 0,02 N.

Signalons une méthode qui permet des résultats proches de ceux de HALDANE et VAN SLYKE : celle de BOLLIGER (25).

Il forme un picrate de globine par action de l'acide picrique sur une solution d'hémoglobine. Ceci au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Après séjour d'une heure à la température de la pièce l'excès d'acide est titré avec du bleu de méthylène. Les calculs permettent de repasser de l'acide picrique à la globine et de la globine à l'hémoglobine.

ROUGHTON - SCHOLANDER (157-158-168) proposent une estimation microgazométrique des gaz du sang ; ceci au moyen d'une seringue spéciale dans laquelle s'effectue le dégagement gazeux et sa mesure par réabsorption sur un corps de référence. Récemment DEMBO et TIKHVINSKII (41) améliorent la technique relative à la détermination de l'oxygène du sang, ainsi que KOPRACHEV (97).

NIZET (130), avec une solution de phénylhydrazine, libère, au contact de l'oxyhémoglobine, un volume d'azote égal à celui de l'oxygène combiné à l'hémoglobine. Mais la phénylhydrazine ne doit pas libérer un gaz de l'hémoglobine réduite ou d'un autre constituant du sang. FLEURY, COURTOIS et GARRIDO (51), utilisent l'hydrate d'hydrazine comme réactif, dans un uréomètre ordinaire qui réduit le volume du sang.

L'acide lactique, le borax sont employés comme agents hémolytiques dans la détermination de l'oxygène lié à l'hémoglobine. Puis un aérosol de dioctyl sulfosuccinate de sodium.

DOBELN et PIRCHER (42) modifient la technique de VAN SLYKE. Ils libèrent l'oxygène du sang par une solution de ferricyanure de potassium et de saponine dans un tampon boraté de pH = 10. Ceci bloque l'oxydation de certains constituants du sang par l'oxygène.

Le spectromètre de Masse (135) permet une analyse des gaz dans le sang, mais avec une certaine différence par rapport à la technique de Van Slyke.

Parmi toutes les modifications relatives à l'analyse des gaz, nous citerons celle de M. J. ARNOUX (6) sur l'appareil de HALDANE, appliqué à l'oximétrie.

Un procédé automatique et instantané pour déterminer l'oxyde de carbone de GIACOMO, GUILLOT et JACQUINOT (60). Le spectre d'absorption d'une goutte de sang est projeté et enregistré sur un film photographique. La détermination maximum est effectuée avec un microphotomètre enregistreur. GAENSLER, CADIGAN, ELLICOTT, JONES et MARKS (57), proposent un appareil spécial fonctionnant dans l'infra-rouge et permettant un rapide dosage de l'oxyde de carbone. Plus tard, MOUREU, CHOVIN, TRUFFERT et LEBBE (115-116) opérant toujours dans l'infra-rouge, déterminent la concentration de l'oxyde de carbone dans le sang par spectrographie. Ils mesurent des changements dans l'intensité de l'absorption infra-rouge en présence d'un gaz de référence.

Un appareil nouveau permet à PAUL (136) de déterminer le pourcentage de saturation en oxygène du sang, directement à la pointe de l'oreille ; ceci d'après la différence d'absorption de deux couleurs (une bande rouge à 650 mμ et une bande infra-rouge à 810 mμ).

ATLAS-WERKE (13) publie les travaux de DORSH et MAASS sur la mise au point d'un appareil selon ce principe.

Les techniques simples, facilement mises en œuvre, sont particulièrement recherchées ; ainsi KLISIECKI (91) mesure les gaz du sang avec un appareil simple. Le volume gazeux dégagé est mesuré dans une pipette capillaire horizontale.

BERKA (22) utilise des sels de paladium pour évaluer l'oxyde de carbone du sang ; de même NESTORESCU et ROVENTA (122) déterminent la carboxyhémoglobine par microdiffusion de l'oxyde de carbone dans une solution de chlorure de paladium. La quantité de cette solution non réduite est évaluée par colorimétrie.

Enfin la technique de HALDANE a subi de nouvelles modifications par GAYTE - SORBIER (59), relatées dans un travail sur la « contribution à l'étude du dosage de l'hémoglobine du sang humain par oxymétrie ».

La quantité maximum d'oxygène ou d'oxyde de carbone fixée « in vitro » par un volume connu de sang correspond à la « capacité respiratoire du sang ». En 1900, de SAINT MARTIN (162) observe que : « toute méthode de dosage de l'hémoglobine basée « sur la détermination de la capacité respiratoire du sang, peut « être radicalement fausse ».

De nos jours, cette opinion est-elle justifiée ? En nous rapportant au chapitre comparatif entre les dosages oxymétriques et ferrimétriques, de GAYTE-SORBIER (59), nous trouvons, dans les cas normaux, un écart de 2 %. Mais, dans les cas pathologiques, les différences sont de l'ordre de 6 à 10 %, largement supérieures aux erreurs de technique. Ce phénomène ne peut encore être exactement expliqué, mais sa présence nous a empêchés d'adopter une technique gazométrique pour effectuer nos études ultérieures. Ces études étant spécifiquement celles de cas pathologiques anormaux présentés par les anémies expérimentales.

V. - METHODES CHIMIQUES BASEES SUR LE DOSAGE DU FER

Dans une espèce animale donnée, la proportion de fer est constante. Pratiquement, tout le fer du sang est de nature hémoglobinique. Donc, connaissant le pourcentage du fer dans l'hémoglobine, soit 0,34 g. pour 100 ml. de sang de l'espèce humaine (169-

192), on peut déterminer, par ferrométrie, l'hémoglobinémie de ce sang.

De très nombreuses méthodes, consistant en des microdosages, car la proportion de fer est relativement très faible dans le sang, ont été établies :

Les méthodes gravimétriques

Les méthodes potentiométriques

Les premières sont inexactes ou trop délicates, les deuxièmes ne possèdent pas une valeur supérieure à d'autres méthodes plus simples.

Les méthodes volumétriques

Les méthodes colorimétriques

méritent d'être examinées.

Parmi les **méthodes volumétriques,** en suivant un ordre chronologique, on note : celle de MOREAU (114) comprenant une minéralisation au rouge sombre très délicate à effectuer ; un lavage à l'eau chaude qui entraîne des pertes ; une dissolution du résidu et une réduction par le zinc très pur en Fe^{++}. Enfin un dosage manganimétrique. Cette méthode, renfermant de nombreuses difficultés, est abandonnée.

NEUMANN (123-124) réalise une kjeldahlisation par un mélange nitro-sulfurique qui entraîne le fer à l'état de Fe^{+++} puis une précipitation par le zinc en milieu ammoniacal. Après transformation en chlorure ferrique le dosage est terminé par iodométrie, selon la technique de Mohr. Comme la précédente, cette méthode présente de nombreux inconvénients.

Celle de KNECHT et HIBBERT (92) est excessivement sensible. Le fer à l'état de chlorure ferrique (Fe^{+++}) est dosé par une solution de chlorure titaneux. Le sulfocyanure d'ammonium sert d'indicateur. Mais il faut opérer à l'abri de l'air : ceci est particulièrement délicat.

Une méthode intéressante de FONTES et THIVOLLE (53-54-55) c'est une application de la molybdo-manganimétrie du fer. FLEURY et MARQUE (52) apportent des modifications : le nitrate ferrique (Fe^{+++}) obtenu après minéralisation est très rapidement réduit par l'acide chlorhydrique et le mercure, avant le dosage proprement dit. Mais ce procédé ne permet pas d'effectuer de rapides dosages en série.

Ceci est également le principal défaut de la technique de MOUSSERON et Mlle CROSS (117). Une incinération à basse température conduit à du chlorure ferrique, précipité ensuite à l'état de bleu de prusse par le ferrocyanure de potassium. L'azote de ce précipité est dosé par microkjeldahlisation sulfurique selon le procédé de PARNASS et WAGNER. Une variante, consistant à

décomposer à l'ébullition, le précipité de ferrocyanure ferrique par l'ammoniaque en présence d'une quantité connue de solution titrée de nitrate d'argent, dont on dose la quantité restante, n'apporte aucun avantage.

IOKHEL'SON (82) calcine le sang en présence d'acide oxalique sec, puis dissout le résidu avec de l'acide nitrique concentré et de l'acide chlorhydrique. Après contact avec l'iodure de potassium cristallisé, l'iode libéré est dosé par le thiosulfate 0,005 N. WEISE (199) décrit une méthode qui demande des manipulations longues ; la prise d'essai est calcinée, le fer passe sous forme d'oxyde ferrique, enfin un titrage iodométrique est effectué. Notons une technique volumétrique d'ARNOUX (5) par titrage de l'oxine dans l'oxinate ferrique.

RAMSAY (150-151-152) propose une microdétermination qui consiste, après destruction organique, à titrer le fer à l'aide du sulfate de titane. Des doses de l'ordre de 10 à 200 μg de fer sont révélées.

VISHNYAKOV et KOGAN (194) réduisent Fe^{+++} en Fe^{++} en faisant passer le liquide chauffé sur du cadmium métallique et terminent par un dosage maganimétrique.

L'usage des complexons est appliqué par HABERLI (66) puis par BONATI et CHIARONI (26) à une méthode de dosage titrimétrique du fer. SCHWARZENBACH et WILLI (171) mettent au point la technique. Le fer, sous forme Fe^{+++} et lié à l'acide sulfosalicylique, est titré à l'aide du complexon III (dihydrate du sel disodique de l'acide éthylène - diamine - tetraacétique). Quand tout le fer est complexé par ce réactif, l'acide sulfosalicylique redevient incolore.

MARTINELLI et TURCHETTO (110), après une minéralisation selon la méthode de Kjeldahl, titrent le précipité d'hydrate ferrique formé par le complexon III.

Ces méthodes volumétriques présentent, selon les techniques établies, une fidélité et une précision très grandes. Ainsi la méthode à l'oxine, par titrage bromoiodométrique de l'oxinate ferrique, est considérée comme une méthode de référence.

Par contre, la méthode au complexon donne des résultats par défaut. Mais toutes ces techniques sont longues et très délicates à effectuer. Elles ne peuvent donc être utilisées pour les mesures usuelles et les dosages en série.

Parmi les **méthodes colorimétriques** :

1° Certaines utilisent la coloration rouge sang du sulfocyanure ferrique ou d'un complexe voisin.

La prise d'essai est minéralisée et tout le fer est transformé en Fe^{+++}. On fait agir ensuite un sulfocyanure alcalin en tenant compte de certains facteurs qui assurent la formation du complexe

coloré tels que d'opérer, en milieu acide, avec un excès de sulfocyanure alcalin et, en présence d'acétone, pour obtenir la non dissociation du composé formé.

Au cours de ces quarante dernières années, on note les réactions de BERMANN (23), KUGELMASS (99)..., la première méthode de WONG (204) réalisant la minéralisation par l'acide chlorhydrique et le chlorate de potassium. Celle de SMITH et COOK (173)..., de FOWWEATHER qui utilise le perhydrol et l'acide sulfurique, d'après la description qu'en donne DOMINICI (45) puis le sulfocyanure d'ammonium très concentré, en présence d'acétone.

La deuxième méthode de WONG (205) faisant agir l'acide sulfurique et le persulfate de potassium pour la minéralisation. La coloration est ensuite obtenue par le sulfocyanure de potassium concentré, en présence d'acétone. Cette dernière méthode est modifiée par FOURCADE (56) qui étudie chaque détail de la manipulation : ainsi, pour minéraliser il s'aide d'un chauffage léger en présence d'acide sulfurique et de persulfate d'ammonium. La précipitation des protéïnes est réalisée par une solution de phosphotungstate de sodium. Après centrifugation, la coloration du fer à l'état Fe^{+++} dans le liquide surnageant est obtenue par le sulfocyanure d'ammonium. Ainsi FOURCADE note une précision supérieure à 2 %, ,de même la précision obtenue par FOWWEATHER est de 2,5 à 3 %. Ces deux méthodes sont intéressantes à retenir ; il semble cependant que les manipulations soient nombreuses et délicates.

Par la suite, on peut noter une microdétermination photométrique de BUCCIARDI (30). L'intensité de l'absorption de la couleur jaune rouge obtenue par le Fe^{+++}, mis en présence de sulfocyanure d'ammonium, est déterminée à l'aide du photomètre de Pullfrich. Ce même photomètre est utilisé par SINOHARA (172), puis MARENZI et LIDA (107). Ces derniers l'adaptent à la méthode de WONG.

VONESCH (197) détermine le fer par la réaction au bleu de prusse.

On trouve la couleur rouge des sels ferriques en présence d'un sulfocyanure, comme point final des techniques de MARANGONI (106), HENRY (78), BELLI-BONI-PANDOLFI (19)...

2° D'autres techniques utilisent la coloration de divers autres composés du fer, notamment celle de certains complexes organiques.

Une couleur rouge développée par le contact du Fe^{++} et de l'alpha alpha'dipyridyl dans certaines conditions de pH, permet une micro-estimation du fer à HILL (79), COOMBS (39), THORP (180), KOUS (94)... et récemment à OKAMOTO (132) qui ajoute de l'hydroquinone.

YOE (209-210) puis PAULAIS (137), après transformation du

fer en Fe^{+++}, forment un complexe coloré avec le « ferron » (acide 7 iodo, 8 hydroxyquinoléine, 5 sulfonique). Les conditions opératoires sont décrites par GAYTE - SORBIER (59).

Un complexe rouge d'ortho-phenanthroline ferreux permet une autre détermination spectrophotométrique à SAYWELL et CUNNINGHAM (165), reprise par DRABKIN (47), BENEZE (20), KATHEN (86) qui ajoute de l'acide tartrique pour former un complexe avec le fer et faciliter le développement de la coloration. Cette technique intéressante est modifiée par la suite : PALMIERI et GIACCA (134) diminuent la prise d'essai et effectuent les lectures au spectrophotomètre de BECKMAN DU.

TYSAROWSKI et KWIEK (182) réduisent Fe^{+++} en Fe^{++} et forment un complexe avec l'acide éthylène diamine tetracétique. Le degré de réduction est déterminé avec l'orthophenanthroline.

NIEDERHAUSERN et FERRARINI (128), reprenant le principe de PETERS (138) et MARQUES (109), proposent l'acide sulfosalicylique pour obtenir une solution colorée ; ceci avec 0,1 ml. de sang préalablement oxydé (Fe^{+++}) et amené à un pH optimum. La sensibilité est très grande ; le fer est révélé dans une dilution de $0{,}2.10^{-6}$.

VONESCH (198) utilise une réaction avec l'acide salicylique.

Une couleur améthyste obtenue avec l'acide gallique est utilisée par VOLMAR et WAGNER (196) pour déterminer les sels ferriques et le fer du sang.

Une couleur rouge donnée à la fois par les ions Fe^{++} et Fe^{+++}, en présence d'acide protocatéchique est utilisée par SALOME-PERFIRA (163-164). Parmi les techniques plus récentes, la spectrophotométrie dans l'ultra-violet (240 mμ) permet à WOOTTON (206) de déterminer le fer sous forme d'un complexe fer-perchlorate dans l'acide perchlorique N.

Ces méthodes colorimétriques, basées sur le dosage du fer, illustrent les avantages incontestables de la colorimétrie.

Les techniques au thiocyanate, du premier groupe, donnent des résultats légèrement inférieurs car la coloration est instable. Dans le deuxième groupe, les techniques à l'αα' dipyridyl, au ferron, à l'ortho phenanthroline concordent tout à fait.

De plus, si le procédé de minéralisation de la matière organique précédant le dosage proprement dit est facilement exécuté, ces méthodes sont dignes d'intérêt, car :

— elles sont précises (écart type 1 %) et très sensibles ;

— elles sont rapides et conviennent donc pour réaliser des dosages en série ;

— elles demandent une prise de sang réduite, donc elles sont faciles à adapter chez les animaux.

Elles répondent alors aux caractéristiques d'une méthode idéale, que nous nous étions proposés de rechercher avant d'entreprendre nos travaux personnels.

⁂

En dehors de la classification que nous avons tracée, quelques procédés tout à fait particuliers sont à signaler :

— **Les méthodes densimétriques** basées sur la détermination de la densité du sang total et du plasma, qui est une fonction linéaire de la teneur en protéines. PHILLIPS et VAN SLYKE (142-143-189) ont mis au point un procédé utilisant des solutions de sulfate de cuivre de densités connues. Une goutte de sang ou de plasma projetée dans ce liquide s'entoure d'un film de protéinate de cuivre, puis tombe si sa densité est supérieure à celle de la solution et remonte dans le cas contraire. Les densités sont établies par comparaisons successives ; à l'aide de tables, on déduit de la teneur en protéines, le taux d'hémoglobine. En effet, on considère que protéines du sang total — protéines du plasma = hémoglobine. Cette technique est reprise très souvent ; par HYNES et LEHMANN (81)..., la préparation des solutions est simplifiée par MARKUZE (108). D'autres liquides peuvent être employés à la place du sulfate de cuivre.

NAKAI (121) détermine le poids spécifique par dilution dans un hydromètre.

KROSCH - HEIDELMANN (98) utilisent un rheoviscosimètre SOPRUNOV et BABAEVA (174) observent le taux de sédimentation de gouttes exactement mesurées dans un mélange de tétrachlorure de carbone et xylène. Des courbes établies permettent de faire la corrélation entre le taux de sédimentation et le poids spécifique.

STEFANOVSKAYA (176), chronomètre la chute de la goutte de sang entre deux points, dans du benzoate du propyle.

Cette détermination du poids spécifique d'une grande simplicité, donne plutôt une estimation de l'hémoglobinémie, estimation précieuse en cas d'hémorragies, brûlures, déshydratation... qu'une mesure précise comme l'observe NICOL (127).

⁂

Indirectement l'hémoglobine est déterminée d'après l'hématocrite par SCHARTUM-HANSEN (166). Le volume de globules rouges est proportionnel à la quantité d'hémoglobine.

⁂

Une méthode polarographique du fer dans les liquides biologiques due à POLI (146). VOJIR (195) parle d'une détermination

polarographique de l'oxygène contenu dans l'hémoglobine. KREUZER (96) modifie ce procédé en apportant des améliorations dans l'appareillage, mais on rencontre des difficultés dans ces manipulations.

***

Un procédé original consiste à faire une détermination réfractométrique au moyen d'un microscope à contraste de phases. Cette méthode de BARER (14) est reprise par SCHNAPPAUF (167) et adaptée à l'étude des erythrocytes de rats.

***

Une autre technique particulière est due à NIEMI (129), c'est une méthode cytophotométrique. L'intensité de lumière de transmission par le spécimen microscopique est estimée par l'analyse de l'argent contenu dans la photomicrographie.

***

Enfin, la radioactivité avec GUYTON, RITTER, SATTERFIELD (65) trouve sa place à côté des autres techniques. Les globules rouges sont rendus radioactifs par contact de l'hémoglobine avec Fe^{59}. La lecture s'effectue dans un tube passant à travers un compteur GEIGER-MULLER. On trouve une relation linéaire entre les lectures et la concentration en hémoglobine du sang.

LEFFINGWELL, MELVILLE et RIESS (100) mesurent les émissions β du Fe^{59} dans un « calculateur ».

***

En conclusion, parmi ces méthodes de dosage de l'hémoglobine, deux groupes, particulièrement le deuxième, nous intéressent par leur possibilité de satisfaire nos conditions expérimentales.

— les méthodes spectrophotométriques,

— les méthodes colorimétriques du dosage du fer.

Discussion sur la valeur de certaines méthodes de dosage de l'hémoglobine au cours des anémies expérimentales

Il nous reste à considérer la valeur des résultats fournis par ces techniques hématologiques lorsqu'on les applique à des sangs de sujets anémiques. Pour cela, il est particulièrement intéressant de reporter ici les résultats des recherches de VERMEULEN (191) dont le but a été de mettre en évidence certaines variations des constituants sanguins au cours, d'une part, d'une anémie expérimentale provoquée chez le rat par inanition protéique prolongée et, d'autre part, sous l'influence des injections d'extraits de foie chez les animaux ainsi anémiés. Citons les principales conclusions de VERMEULEN :

« Les recherches de pathologie expérimentale que nous avons poursuivies sur l'anémie provoquée chez le rat blanc par inanition

protéique, nous ont conduit à préciser les caractères de cette anémie par carence, laquelle a pu servir de base à un test biologique de l'activité des extraits hépatiques.

« L'inanition protéique permet d'obtenir une anémie présentant les caractères suivants : au bout de 30 à 35 jours du régime dépourvu de protides, les animaux subissent une perte azotée considérable. Ainsi que l'ont montré A. et J. ROCHE, cette perte azotée ne peut être réparée que dans des conditions tout à fait particulières, si bien que, en général, on peut la considérer comme irréversible. L'examen du sang de ces animaux inanitiés montre la gravité de l'anémie dont ils sont atteints. Le nombre des hématies ne représente plus que 50 % de la valeur normale. Ces hématies sont riches en hémoglobine ; l'anémie est nettement de caractère hyperchrome. Par cela, cette anémie se rapproche de l'anémie de BIERMER (diminution considérable du nombre des hématies ; valeur globulaire très élevée). Cependant on ne peut identifier pour autant l'anémie par inanition protéique à l'anémie de BIERMER.

« Les rats anémiés par inanition protéique réagissent à une injection unique d'extrait hépatique, reconnu par ailleurs actif dans l'anémie pernicieuse humaine, de la façon suivante : la chute du nombre de globules rouges paraît nettement freinée dans les premiers jours qui suivent l'injection mais, étant donné que les animaux demeurent soumis au régime sans azote, on n'observe aucune régénération globulaire. Au contraire, par la suite, le nombre des hématies diminue avec une vitesse accélérée et tout se passe comme si l'excitation de l'hématopoïèse sous l'effet du médicament avait complètement épuisé les réserves de l'animal. Cependant les réactions les plus nettes observées à la suite de cette injection unique d'extrait hépatique, résident dans une importante chute de la valeur globulaire, chute qui atteint son maximum d'intensité le cinquième jour après ce traitement. Ce minimum de la valeur globulaire coïncide avec le maximum d'une forte crise réticulocytaire ».

Sur ces bases, VERMEULEN a proposé un test qualitatif et quantitatif de l'activité antipernicieuse des extraits de foie et de la vitamine B.12. Ce test consiste essentiellement à rechercher la plus faible dose d'une préparation anti-anémique capable de provoquer chez le rat blanc anémié, par inanition protéique, les trois réactions hématologiques suivantes :

1° une chute des globules rouges nettement freinée dans les premiers jours suivant l'injection ;

2° une importante chute de la valeur globulaire (qui atteint son maximum d'intensité le cinquième jour après le traitement) ;

3° l'apparition simultanée d'une forte crise réticulocytaire.

En résumé, nous retiendrons que VERMEULEN observe, au cours de l'anémie protéiprive chez le rat blanc, une anémie de **type hyperchrome** et note un nombre faible mais constant de réticulocytes dont le taux augmente après une injection de substance antianémique telle que les extraits hépatiques.

Les hématies étant riches en hémoglobine, cela paraît rapprocher cette anémie expérimentale de l'anémie de Biermer.

***

Ces résultats sont en contradiction avec les recherches d'ASCHKENASY (7) qui observe une anémie **hypochrome** et microcytique. ASCHKENASY décèle dans le sang circulant un nombre croissant de réticulocytes et une augmentation de la teneur du sang en érythroblastes (absents ou rares dans le sang du rat normal) lorsque la carence protéique se prolonge. Ces données indiquent un rajeunissement de la population érythrocytaire du sang.

Cet auteur donne deux explications possibles à cet état de choses :

« D'une part, l'anémie proteiprive résulte d'un arrêt de matu-
« ration de la lignée érythrocytaire ;

« D'autre part, elle est la conséquence d'une hémolyse exces-
« sive.

« 1° Il y a tout lieu de penser que l'arrêt de maturation se
« produit à deux stades différents du développement erythrocy-
« taire. Le premier blocage empêche les érythroblastes de se
« débarrasser de leurs noyaux pour se transformer en réticulo-
« cytes, d'où accumulation de petites hématies nuclées (normo-
« blastes) à l'intérieur de la moelle. C'est la suppression de ce
« blocage qui est à l'origine de la décharge massive de réticulo-
« cytes telle qu'on l'observe dans le sang pendant la réparation
« de l'anémie entre les troisième et dixième jours d'une réalimen-
« tation azotée ASCHKENASY et ASCHKENASY-LELU (9).

« Le deuxième blocage s'oppose à la maturation des réticulo-
« cytes eux-mêmes. Ce blocage est suggéré par la constatation
« faite par NIZET (131) que des réticulocytes provenant du sang
« de chiens privés de protéines alimentaires et soumis à l'incuba-
« tion in vitro, à la température de l'organisme, sont incapables
« de se transformer en hématies adultes, comme peuvent le faire,
« dans les mêmes conditions expérimentales, les réticulocytes de
« chiens non carencés. Or le pouvoir de maturation peut être
« restitué à ces cellules par la simple addition au sang carencé
« d'un mélange d'acides aminés.

« In vivo, ce blocage de maturation des réticulocytes est sup-
« primé également si l'on répare des rats carencés avec un régime
« largement pourvu en protéines. Cependant, si l'apport protéique
« est insuffisant, seule la transformation des érythroblastes en

« réticulocytes peut avoir lieu et non pas celle des réticulocytes en « hématies adultes : il en résulte une accumulation de réticulo- « cytes dans le sang et le nombre de ces cellules augmente en « même temps que s'accentue l'anémie, jusqu'à ce que les rats « succombent, la tentative de réparation ayant échoué.

« 2° Diverses constatations conduisent à penser que l'anémie « protéiprive n'est pas seulement due à des blocages de matura- « tion, mais aussi à une hémolyse excessive.

« En effet, les globules rouges de rats carencés accusent une « augmentation de leur fragilité, mécanique (DELMONTE 40) et « de leur fragilité chimique à l'égard de la digitonine, ASCHKE- « NASY, DELMONTE et EYQUEM (10) et de la saponine (40). Ils « résistent également moins bien à l'alcalinisation que les globules « rouges normaux (40).

« In vivo, la survie de globules rouges provenant de rats « carencés est, après leur marquage au chrome radioactif et leur « injection à des rats normaux, significativement plus brève que « celle des globules rouges provenant de rats non carencés, « ASCHKENASY, DELMONTE, GUERIN et GUERIN (11). « Cette hémolyse est due, non seulement à une altération struc- « turale des globules rouges eux-mêmes (surtout de leur mem- « brane cellulaire), mais aussi à une absence de protection par « le plasma sanguin dont la teneur en facteurs anti-hémolytiques « se trouve diminuée par suite de la carence en protéines.

« En effet, on obtient une protection bien plus importante « des globules rouges « carencés » contre les saponinosides, la « traumatisation mécanique ou l'alcalinisation, si l'on ajoute à ces « globules du sérum normal à la place du sérum « carencé » (40).

« Etant donné que l'hémolyse par les saponinosides peut être « réduite également par l'addition de lécithine, on peut se deman- « der si l'insuffisance de la protection exercée par le sérum « « carencé » ne doit pas être attribuée entre autres à la faible « teneur de ce dernier en phospholipides, teneur qui est de quel- « que 0,05 à 0,06 g. pour 100 cm3 de sérum chez des rats carencés « en protéines contre environ 0,10 g. pour 100 chez des rats nor- « maux (40).

« Quoi qu'il en soit, toutes les données précédentes font « conclure à une origine au moins partiellement hémolytique de « l'anémie protéiprive.

« C'est manifestement cette hémolyse excessive qui est res- « ponsable de la présence de dépôts de l'hémosidérine dans la rate « de rats carencés en protéines (ASCHKENASY, 1946 (7)) ainsi « que de l'augmentation de la bilirubine dans le sérum sanguin « et de l'urobiline dans les urines chez ces mêmes animaux « (ASCHKENASY, 1952 (8).)

« C'est probablement à une régénération compensatrice de la

« moelle que l'on doit attribuer la présence de nombreux réticu-
« locytes et érythroblastes dans le sang circulant de rats anémiés
« par l'inanition protéique dès avant toute tentative de réparation
« de cette anémie (7). Ce phénomène est analogue à la réticulose
« sanguine observée dans les anémies hémolytiques humaines. Il
« n'a pas du tout la même signification que les décharges réticu-
« locytaires et érythroblastiques massives observées chez des rats
« carencés dans les premiers jours de régimes de réparation (9),
« décharges qui, elles, semblent provoquées par une suppression
« du blocage médullaire ».

Nous venons de confronter les recherches de VERMEULEN et celles d'ASCHKENASY qui ont tous deux donné des résultats d'examens hématologiques divers, au cours de l'anémie par inaniton protéique. On voit se manifester un désaccord essentiel dans les conclusions de ces auteurs dont nous retiendrons surtout que VERMEULEN conclut à l'instauration d'une anémie hyperchrome et ASCHKENASY à celle d'une anémie hypochrome et microcytique.

Devant ces données contradictoires, certaines recherches méritent d'être reprises pour vérifier si l'un ou l'autre de ces auteurs n'aurait été induit en erreur, par un artefact pouvant provenir des méthodes hématologiques mises en œuvre. L'intérêt de telles recherches nous paraît surtout découler de la fragilité globulaire sur laquelle insistent ASCHKENASY et Coll.

OBJET DU TRAVAIL

Au cours de notre travail, nous avons, en premier lieu, cherché à mettre au point une technique de dosage de l'hémoglobine pouvant être pratiquée chez le rat (prise d'essai réduite) et basée sur la teneur en fer. En effet, une méthode basée sur ce principe semble offrir le maximum de précision comme le montre l'analyse des travaux antérieurs relatifs au dosage de ce chromogène dans le sang.

Nous avons ensuite comparé chez l'homme, sur des sujets normaux et sur des sujets présentant une anémie, la technique que nous proposons et celle préconisée par VERMEULEN.

Enfin, dans une dernière partie de notre travail, nous avons appliqué notre méthode de dosage de l'hémoglobine au rat blanc anémié :

D'une part, par inanition protéique complétée par une légère intoxication plombique suivie d'une détoxication de l'organisme et, d'autre part, par absorption « per os » de résine échangeuse d'ions mélangée à un régime complet, dans le but de modifier l'acidité stomacale par blocage de l'acide chlorhydrique.

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIERE PARTIE

MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE PAR LA DETERMINATION DU FER TOTAL SANGUIN

A) DOSAGE DU FER EN SOLUTION PURE.

Ainsi que nous l'avons déjà dit, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une technique permettant de doser le fer, en solution pure. Nous avons adopté pour cela la coloration du complexe formé par l'ion ferrique et l'antipyrine.

Tout d'abord, nous avons déterminé le **spectre d'absorption** de la coloration jaune obtenue. Nous avons noté, au spectrophotomètre de M. JEAN et R. CONSTANT, une absorption maximum pour la longueur d'onde $\lambda = 430$ mμ. Toutefois, afin d'obtenir une plus grande sensibilité, nous avons effectué nos lectures à une longueur d'onde $\lambda = 450$ mμ.

Pour mettre au point notre technique analytique, il était nécessaire de préparer une **solution étalon d'un sel de fer.** Nous l'avons réalisée en dissolvant 0,860 g. de sulfate de fer et d'ammonium ($Fe(NH_4)(SO_4)_2\ 12\ H_2O$ PM : 482) dans 1 l. d'eau distillée acidifiée par 2 ml. d'acide sulfurique (solution à 100 mg. fer par litre). Nous avons ensuite effectué une dilution au 1/10e afin d'ob-

tenir une solution à 10 g par ml. ; sur une prise d'essai de 3 ml. (qui apporte donc 30 µg de fer), nous avons entrepris les expériences suivantes dans le but d'étudier les différents facteurs susceptibles d'avoir une influence sur la coloration :

la concentration en antipyrine

le pH du milieu réactionnel.

1° Influence de la concentration en antipyrine sur l'intensité de la coloration.

Dans une série de six tubes à essai, nous avons mesuré 3 ml. de la solution étalon du sel de fer, nous avons ajouté des quantités croissantes d'une solution d'antipyrine à 20 %, soit 1,25, 2,5, 3,75, 5, 6, 7 ml. et nous avons complété le volume à 10 ml. avec de l'eau distillée. Ainsi, nous avons réalisé différents essais pour lesquels une même quantité de fer (30 µg) est mise en présence de quantités croissantes d'antipyrine, ce qui correspond à des concentrations de cette substance respectivement égales à 2,5, 5, 7,5, 10, 12 et 14 %.

Nous avons déterminé, sur chacun de ces essais, l'intensité de l'absorption colorimétrique à 450 mµ sous 2 cm. d'épaisseur. Nous avons rassemblé, dans le tableau n° I, les résultats relatifs à cette expérience.

TABLEAU I

Intensité de l'absorption colorimétrique en fonction de la concentration en antipyrine

Concentration en antipyrine	*Absorption colorimétrique*
2,5%	56
5 %	65
7,5%	65
10 %	70
12 %	70
14 %	70

L'examen de ces résultats montre que l'intensité de la coloration est constante et maximum à partir d'une concentration de 10 % en antipyrine.

2° Influence du pH dans la réaction.

Nous avons recherché si le pH de la solution avait une influence sur l'intensité de la réaction colorée. Nous avons préparé une solution d'acétate de sodium à 50 g. pour 100 ml. et une solution

d'acide sulfurique 9 N : ceci pour nous permettre d'établir une gamme de pH allant de 2,2 à 5.

Dans chaque tube, nous avons placé :

2 ml. de solution étalon de sel de fer (20 μg de fer)

2 ml. de solution d'acétate de sodium à 50 g. pour 100 ml.

0 ml. à 2,5 ml. de solution d'acide sulfurique 9 N.

Nous avons complété à 10 ml. Enfin, nous avons ajouté : 10 ml. de solution d'antipyrine à 20 %.

Nous avons déterminé l'absorption photométrique, puis nous avons mesuré le pH de chaque liqueur au pH mètre (électrode de verre). Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau n° II.

TABLEAU II

Influence de l'acidité sur l'intensité de la coloration

pH	*Absorption colorimétrique*
5	41
4,6	47
4,4	46,5
4,2	47
3,6	46
3,2	46
3	45
2,5	39,5
2,3	32
2,2	31

D'après l'examen de ce tableau, les valeurs des pH, comprises entre 4,5 et 4,2 donnent une intensité de coloration maximum.

Nous avons également vérifié **la stabilité de la coloration en fonction du temps.** Cette étude nous a appris que la coloration est stable pendant 5 heures au minimum. Ceci nous a amenés à fixer les conditions suivantes pour :

le dosage du fer en solution pure

Dans un tube à essai, on place successivement :

3,2 ml. au maximum de solution étalon de sel de fer (1).

0,8 ml. de solution d'acide sulfurique 9 N.

1 ml. de solution à 50 g. p. 100 ml. d'acétate de sodium.

(1) On prépare un essai témoin en remplaçant la solution ferrique par un égal volume d'eau distillée.

On complète le volume à 5 ml., si cela est nécessaire, avec de l'eau distillée. On ajoute 5 ml. de solution à 20 g. pour 100 ml. d'antipyrine.

On mélange et on lit au photocolorimètre en cuve de 2 cm. d'épaisseur et pour une longueur d'onde $\lambda = 450$ mμ.

Dans ces conditions opératoires, nous avons établi une courbe d'étalonnage entre les limites de 7,5 et 37,5 μg de fer. Nous avons rassemblé nos résultats dans le tableau n° III.

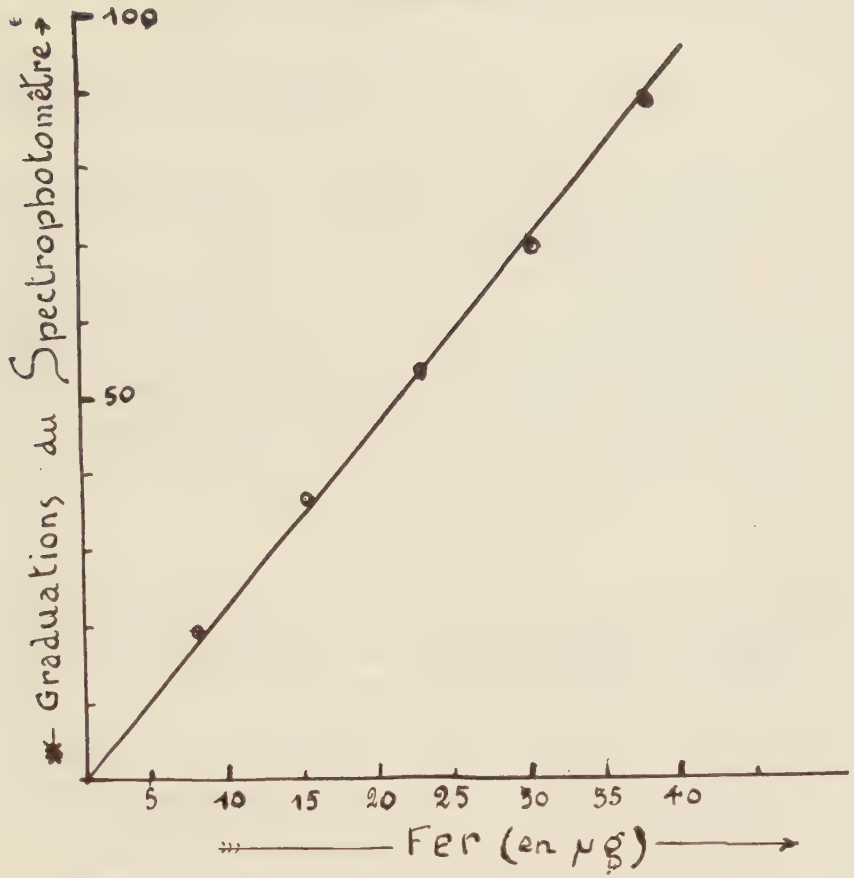
TABLEAU III

Etalonnage du dosage colorimétrique du fer par notre méthode

Fer (en μg)	*Absorption colorimétrique*
7,5	19,5
15	36,5
22,5	53
30	70
37,5	89

Pour obtenir le graphique représentant la courbe d'étalonnage on porte, en ordonnée, le nombre des graduations du spectrophotomètre et en abcisse les quantités correspondantes de fer mises en œuvre dans les prises d'essai.

— COURBE I —



Courbe d'étalonnage du dosage calorimétrique du fer en solution pure dans les conditions de notre technique.

On constate que le graphique obtenu est une droite.

B) DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE DANS LE SANG PAR LA DETERMINATION DU FER TOTAL SANGUIN.

Actuellement, tous les auteurs sont unanimes à reconnaître, pour la molécule d'hémoglobine, un poids moléculaire égal à 68.000. La molécule contient quatre atomes de fer. .

Tout le fer sanguin est pratiquement de nature hémoglobinique. Le « fer circulant plasmatique » et le fer renfermé dans les leucocytes, sont à l'état de traces.

Pour l'espèce humaine, le pourcentage de fer dans l'hémoglobine, le plus communément admis, est 0,34 p. 100. Dès lors, il sera très simple de déduire l'hémoglobinémie du sang d'après la ferrométrie.

Nous avons établi une **courbe d'étalonnage** de notre méthode à partir d'une solution étalon de sel de fer. L'hémoglobine contient

0,34 % de fer, c'est-à-dire que un microgramme de fer est contenu dans :

$$\frac{100 \times 1}{0{,}34} = 294 \text{ microgrammes d'hémoglobine}$$

Ceci nous permet alors de construire un graphique que nous avons utilisé dans la suite de notre travail, exprimé non pas en fer mais en quantité d'hémoglobine correspondante.

Nous avons adopté, pour l'ensemble de nos dosages sur le sang, une prise d'essai standard de 0,05 ml. de ce liquide biologique. Un simple calcul nous a donc permis d'établir un **graphique** de l'absorption photométrique en fonction de la quantité d'hémoglobine exprimée en grammes d'hémoglobine par litre.

Dans le tableau n° IV, nous avons rassemblé les valeurs ainsi calculées :

TABLEAU IV

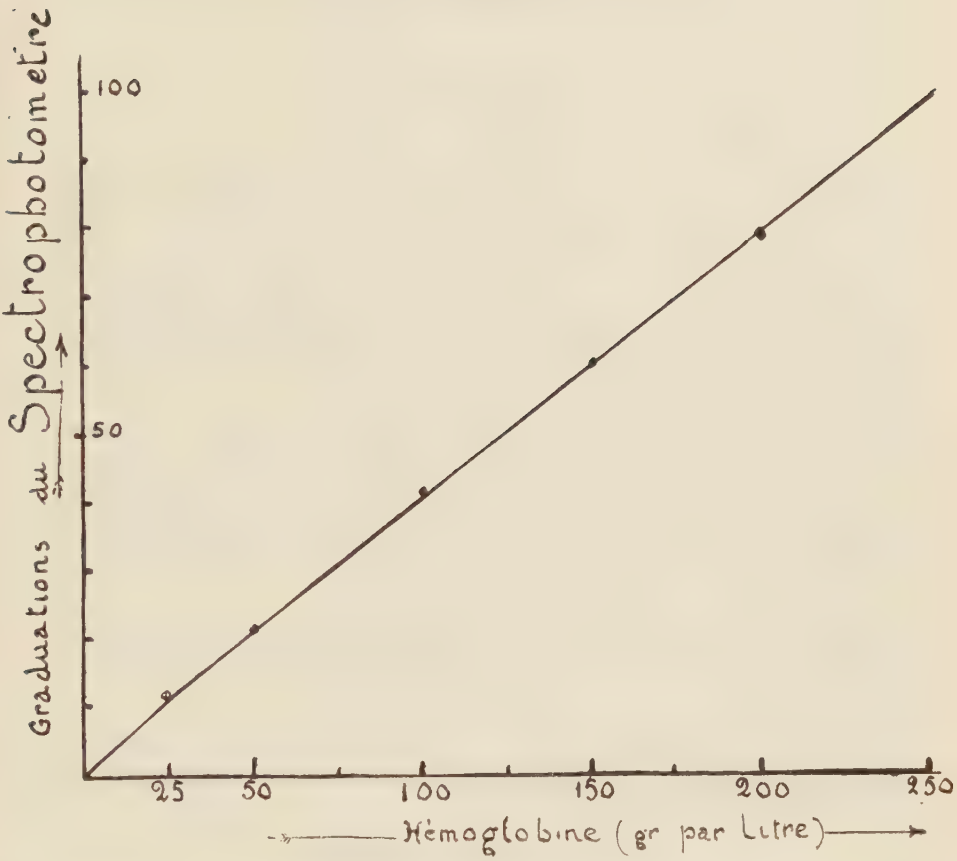
Valeurs permettant d'établir un graphique de l'absorption photométrique de l'hémoglobinémie (en grammes d'hémoglobine par litre) dans les conditions de notre technique.

Graduations du spectrophotomètre	*Hémoglobine (g. par litre)*
12	25
22	50
42	100
61	150
80	200
100	250

D'après l'examen de ce tableau, nous pouvons déterminer l'hémoglobinémie pour des valeurs allant de 30 à 250 g. d'hémoglobine par litre. Nous pouvons donc espérer doser l'hémoglobine même dans les cas d'anémie grave. Ceci avec une bonne précision, puisque le dosage donne des valeurs correctes pour une valeur minime de 30 g. d'hémoglobine par litre, ce qui correspond à un sang contenant environ 1 million d'hématies par mm3.

On peut, si on le désire, augmenter encore la précision de la méthode dans les cas extrêmes, en réalisant le dosage sur une prise d'essai double, soit 0,10 ml.

— COURBE II —



Graphique exprimant directement l'hémoglobinémie du sang, en grammes par litre, d'après le dosage du fer effectué selon notre technique.

Pour appliquer notre technique au dosage du fer dans le sang, nous devions, au préalable, effectuer **la minéralisation** de ce sang.

Après avoir étudié différents procédés, nous avons constaté qu'il fallait abandonner les techniques par voie sèche et en présence d'acide chlorhydrique, car elles entraînaient des pertes.

Nous avons obtenu des résultats très satisfaisants par une minéralisation basée sur la destruction en milieu sulfurique et en présence de perhydrol. C'est un procédé décrit par DOMINICI (45) repris par FOWWEATHER. Par la suite, nous avons observé que la présence de traces de perhydrol dans la solution conduit au développement d'une coloration rouge qui gène le dosage. Mais la destruction du perhydrol en excès peut être réalisée par le chauffage de la solution acide, quelques minutes au bain-marie bouillant.

Après de nombreux essais, qu'il serait fastidieux de relater ici, nous avons mis au point la technique suivante :

LES REACTIFS

Acide sulfurique 9N.

Perhydrol électrolytique.

Solution à 50 g. p. 100 ml. d'acétate de sodium cristallisé.

Solution à 20 g. p. 100 ml. d'antipyrine.

Eau bidistillée. — Toutes les solutions et les dilutions sont effectuées avec de l'eau distillée puis déminéralisée, par passage sur des résines échangeuses d'ions (amberlite IRC 50). Cette précaution permet d'éliminer toutes traces de métaux susceptibles d'apporter des erreurs dans notre dosage.

La solution d'acide sulfurique est préparée à partir de l'acide sulfurique concentré R.P. et doit être 9N.

Le perhydrol électrolytique (Prolabo) est constitué par une solution d'eau oxygénée à 110 volumes. Il doit être conservé à la glacière.

La solution d'acétate de sodium cristallisé. — Il s'agit de $CH_3COONa\ 3\ H_2O$ PM : 136 (3,67 M), 50 grammes de ce produit se dissolvent facilement dans l'eau bidistillée. On porte le volume à 100 ml.

La solution d'antipyrine. — La dissolution doit s'effectuer à chaud à raison de 20 grammes d'antipyrine portés dans un volume final de 100 ml. d'eau bidistillée.

LA MINERALISATION

Dans un tube à essai pyrex jaugé à 10 ml. on place 1 ml. d'une dilution au 1/20e de sang total (ou 0,05 ml. de sang total.) (1)

On évapore doucement jusqu'à concentration à 0,2 ml. environ.

On ajoute 0,5 ml. d'acide sulfurique 9 N. On chauffe légèrement (les mousses sont redoutables, il faut manipuler très soigneusement) jusqu'à concentration à 0,2 ml. environ.

Dans le tube refroidi, on ajoute V à VI gouttes de perhydrol. Le tube est placé au-dessus d'une lampe à infra-rouges (à 1 cm. environ). On laisse évaporer jusqu'à l'émission de vapeurs blanches dans le bas du tube. On refroidit et on recommence l'opération jusqu'à ce que l'acide sulfurique ne soit plus coloré en brun.

---

(1) Simultanément on prépare un essai-témoin. On remplace le sang par un égal volume d'eau bidistillée et on effectue exactement les mêms opérations : la minéralisation, puis le dosage.

Après refroidissement, on ajoute :

2 ml. environ d'eau bidistillée
1 ml. d'acétate de sodium à 50 g. p. 100 ml.

On porte au bain-marie 10 minutes, on laisse refroidir.

On ajoute 5 ml. d'antipyrine à 20 g. p. 100 ml. et on complète au trait de jauge avec de l'eau bidistillée. On détermine l'absorption photométrique en cuve de 2 cm. d'épaisseur et à une longueur $\lambda = 450$ mμ.

On se réfère au graphique d'étalonnage que nous avons établi précédemment, à partir du dosage du fer en solution pure.

Afin de tester **la fidélité de notre technique** et la reproductibilité des résultats expérimentaux, nous avons déterminé l'hémoglobinémie de 10 sangs humains normaux et anémiques ; pour un même sang, nous avons réalisé deux déterminations.

Les résultats de cette expérience sont rassemblés dans le tableau n° V.

TABLEAU V

Fidélité de la méthode

Numéro de l'échantillon	*Grammes d'hémoglobine (par litre)*		*Ecarts entre deux déterminations (en g. d'hémoglobine/lt)*
—	—	—	—
1	167	165	2
2	176	171	5
3	176	174	2
4	176	173	3
5	164	164	0
6	143	142	1
7	111	109	2
8	84	82	2
9	71	69	2
10	64	61	3

De l'examen de ce tableau il ressort que notre méthode conduit à des erreurs absolues sur deux dosages de l'ordre de 3 g. d'hémoglobine par litre. De ce fait, les erreurs relatives sont de l'ordre de + ou — 3 % au maximum et le plus souvent de + ou — 1 à 2 %. De plus, dans les cas étudiés, comme nous pouvions nous y attendre, notre technique présente la même fidélité lorsqu'elle est appliquée à des sangs de sujets normaux ou anémiés.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE COMPARÉE DU DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE DANS LE SANG TOTAL

d'après la méthode spectrophotométrique de VERMEULEN et la méthode ferrométrique que nous proposons

Quelques contradictions existent entre les recherches d'ASCHKENASY et celles de VERMEULEN concernant les anémies expérimentales chez le rat blanc et les valeurs globulaires obtenues dans ce cas.

Etant donné que nous avons mis au point une technique de dosage de l'hémoglobine, dont nous avons vérifié le degré de précision, nous avons pensé à la comparer avec celle préconisée par VERMEULEN.

Dans notre rappel des différentes méthodes de dosage de l'hémoglobine, nous avons cité la technique de VERMEULEN parmi les méthodes spectrophotométriques : « c'est une microméthode « colorimétrique de dosage de l'hémoglobine basée sur sa trans- « formation en un dérivé stable : la methémoglobine. L'agent oxy- « dant utilisé dans ce but, le ferricyanure de potassium, donne « quantitativement naissance à de la méthémoglobine à partir de « l'hémoglobine.

« La pratique de dosage est la suivante : à l'aide d'une micro-

« pipette sèche, prélever 0,05 ml. de sang et le porter dans un tube « contenant 5 ml. d'eau distillée. Ajouter 1 ml. de solution fraîche- « ment préparée de ferricyanure de potassium à 10 pour 100 ml., « agiter délicatement.

« Centrifuger la solution de méthémoglobine obtenue (10 mi- « nutes à 6.000 tours minute) ou filtrer (papier Durieux bleu n° 111 « à filtration lente) pour éliminer les leucocytes et les stromas ; « préparer un tube contenant les réactifs seuls :

« 5 ml. d'eau distillée,

« 1 ml. de solution de ferricyanure de potassium.

« Mesurer au photocolorimètre cuve de 1 cm., filtre bleu vert, « longueur d'onde λ = 500 mμ, la densité optique des deux solu- « tions ; déduire de la valeur trouvée pour l'essai, la valeur obte- « nue pour les réactifs seuls. Nous avons utilisé le spectrophoto- « mètre de Pulfrich.

« Pour établir la **courbe de référence,** on utilise une solution « d'hémoglobine pure cristallisée dont on aura dosé le fer. Le gra- « phique est une droite (les mesures étant exprimées en densité « optique) passant par l'origine... »

La précision, d'après VERMEULEN, est + ou — 2 %.

***

Nous avons établi une **courbe de référence** à partir d'une solution d'hémoglobine à 2 mg. par ml., dont nous avons dosé le fer à l'aide de notre méthode. Cette courbe a été tracée pour des quantités d'hémoglobine allant de 0 à 10 mg. de cette chromoprotéide dans la prise d'essai.

Appliquée au sang (sur une prise d'essai standard de 0,05 ml.), cette courbe d'étalonnage peut être exprimée en unité photométrique en fonction de la quantité d'hémoglobine en g. par litre (soit 0 à 200 g. par litre). Toutes nos lectures ont été effectuées au spectrophotomètre de M. JEAN et R. CONSTANT à 500 mμ, en cuve de 1 cm. d'épaisseur.

Nous pouvions alors entreprendre une étude comparée entre cette méthode basée sur la spectrophotométrie de la méthémoglobine et celle, que nous proposons, basée sur la ferrométrie.

Au cours d'expériences préliminaires nous avons néanmoins constaté que dans la technique de VERMEULEN, il n'était pas indifférent, après la formation de méthémoglobine, de filtrer ou de centrifuger afin d'éliminer les stromas. Ainsi, nous avons adopté, pour cette opération, uniquement la filtration.

Nos expériences ont porté sur des sangs de sujets humains normaux et anémiés. Sur un même échantillon sanguin, nous avons déterminé l'hémoglobinémie d'après la technique de VERMEULEN d'une part, et d'après notre technique ferrométrique,

d'autre part. Puis notre étude s'est poursuivie en comparant les résultats obtenus que nous avons réunis dans le tableau n° VI.

TABLEAU VI

Comparaison du dosage de l'hémoglobine (exprimée en g. par litre) effectué, d'une part, par la technique de VERMEULEN et, d'autre part, par la méthode ferrométrique que nous avons mise au point, sur des sangs de sujets humains normaux et anémiés.

Hématies (N) par mm³ $N \times 10^6$	*Hémoglobine (g. par litre)*		*Ecarts entre les 2 déterminations (en g. d'hémoglobine par litre)*
	Technique de Vermeulen	*Ferrométrie*	
—	—	—	—
5,00	175	170	+ 5
4.98	173	162	+ 11
4.80	165	161	+ 4
4,10	144	137	+ 7
4,02	146	134	+ 12
4,23	175	141	+ 34
3,98	128	130	— 2
4,00	136	131	+ 5
3,85	138	125	+ 13
3,90	144	127	+ 17
3,25	126	91	+ 35
3,70	115	111	+ 4
3,40	120	105	+ 15
2,56	84	74	+ 10
2,56	106	76	+ 30

En examinant ce tableau, nous voyons que les trois premiers résultats concernent des sangs de sujets normaux. Les taux d'hémoglobine dosés par la technique de VERMEULEN sont supérieurs à ceux obtenus par la technique ferrométrique et la différence peut atteindre jusqu'à une augmentation de l'ordre de 11 g. (d'hémoglobine par litre).

Les résultats suivants s'appliquent à des sangs de sujets anémiés. Il est intéressant d'observer alors que les différences dont nous venons de parler sont nettement augmentées. On note un taux d'hémoglobine dosé par la technique de VERMEULEN supérieur de 35 g. (d'hémoglobine par litre) par rapport à celui déterminé par ferrométrie.

Parmi ces 12 échantillons de sang, un seul conduit à une différence légèrement inversée, c'est-à-dire que le taux d'hémoglo-

bine dosé par ferrométrie est légèrement supérieur de 2 g. par litre, à celui obtenu par la technique de VERMEULEN.

Afin d'expliquer ces faits expérimentaux, nous devons nous souvenir de l'aspect présenté par les solutions de méthémoglobine, au cours du dosage effectué selon le procédé de VERMEULEN. Nous pouvons dire que les filtrations (sur papier Durieux bleu n° 111) sont très lentes et que les solutions de méthémoglobine ne sont jamais absolument limpides. Et, particulièrement, lorsque les sujets présentent une anémie, le trouble des solutions de methémoglobine est augmenté.

Il paraît assez difficile de proposer une explication à ce phénomène. Mais il nous a été donné de le constater et d'expliquer immédiatement, de la sorte, les différences que nous avons obtenues. En effet, si on est en présence d'une solution même légèrement trouble, tout dosage spectrophotométrique perd sa valeur, même si ce dosage présente une sensibilité proche de l'idéal analytique.

TROISIEME PARTIE

DETERMINATION DE LA VALEUR GLOBULAIRE CHEZ LE RAT BLANC ANÉMIÉ

Ainsi que nous l'avons dit dans notre introduction, il nous a paru intéressant de rechercher quelles pouvaient être les causes du désaccord existant entre les recherches d'ASCHKENASY et celles de VERMEULEN.

Rappelons brièvement qu'au cours de l'anémie protéiprive chez le rat blanc, ASCHKENASY observe une anémie hypochrome et microcytique et décèle, dans le sang circulant, un nombre croissant de réticulocytes et une augmentation de la teneur du sang en erythroblastes lorsque la carence protéique se prolonge.

VERMEULEN note une anémie hyperchrome et un nombre faible mais constant de réticulocytes dont le taux augmente après injection de substance antianémique telle que les extraits hépatiques.

Pour étudier, à notre tour, les phénomènes rencontrés au cours de l'anémie, il fallait tout d'abord nous placer dans des conditions voisines de celles décrites par les auteurs précédemment cités.

Pour déceler et suivre ces anémies, nous avons mis en œuvre les techniques suivantes :

— l'étude de la courbe de poids des animaux,
— la numération globulaire,
— le dosage de l'hémoglobine.

L'étude de la courbe de poids.

Le poids des animaux est noté régulièrement, en fonction du temps imparti à chaque expérience.

La prise de sang permet de réaliser les investigations suivantes. Selon le procédé très simple de VERMEULEN, on prélève le sang de l'animal à l'extrémité de la queue, après section nette ; on place ensuite une ligature afin d'éviter toute hémorragie.

La numération globulaire.

Nous avons effectué les numérations, selon les procédés classiques, au moyen de la cellule de Malassez à remplissage par capillarité.

Le dosage de l'hémoglobine.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la technique de VERMEULEN conduit à des dosages d'hémoglobine par excès. Connaissant cet inconvénient, nous avons préféré utiliser notre méthode ferrométrique en exprimant les résultats en poids d'hémoglobine par mm3 de sang (soit en μg).

La connaissance du nombre d'hématies et du taux d'hémoglobine par mm3 nous a permis de calculer **la valeur globulaire** qui représente la quantité d'hémoglobine contenue dans une hématie. Le poids d'hémoglobine par mm3 est divisé par le nombre de globules rouges présents dans le même volume et, le résultat exprimé en micromicrogrammes d'hémoglobine par hématie ($1 \mu\mu g = 10^{-12}$ g.).

Au cours de nos expériences préliminaires, nous avons cherché à reproduire les anémies obtenues par VERMEULEN. Les animaux étant soumis au régime privé de protéines, leurs réactions nous ont conduit aux conclusions suivantes :

— Il faut attendre de nombreux jours avant l'apparition d'une anémie. En moyenne, nous avons compté 35 à 40 jours.
— De plus, lorsque cette période physiologique intéressante est atteinte, la mortalité des animaux devient très élevée. Les études au cours de cet état anémique sont gravement compromises et ne peuvent être significatives, puisque seul un petit nombre d'animaux reste en expérience.

Nous nous sommes proposés d'obtenir des anémies expérimentales par d'autres procédés. Nous avons pensé à appliquer les deux protocoles suivants :

1° Les animaux sont soumis à l'inanition protéique mais on active le délai d'obtention de l'anémie par une intoxication plombique. Ensuite, pour être à l'abri des critiques des anémies par intoxication, on détoxique l'organisme du rat par le versénate double de calcium et de sodium.

En attendant qu'un équilibre physiologique s'établisse, les animaux sont maintenus à la diète protéique.

2° Chez le Biermerien, qui présente une anémie grave, l'estomac est inactif parce qu'il est achlorhydrique. Pour reproduire un phénomène semblable chez le rat, nous cherchons à bloquer son acidité gastrique en mélangeant au régime une résine échangeuse d'anions (amberlite IRA 400).

Nous étudions alors les anémies obtenues à l'aide des techniques précédemment exposées.

I. - ANEMIE PROVOQUEE SIMULTANEMENT PAR INANITION PROTEIQUE ET UNE LEGERE INTOXICATION PLOMBIQUE.

Pendant toute la durée de nos expériences, les animaux sont soumis à un régime privé de protéines préparé de la façon suivante :

Saccharose	1.000 g.	
Amidon	1.000 g.	
Beurre lavé	75 g.	(1)
Huile	200 g.	
Mélange d'Osborne	166 g.	(2)
Cellulose	166 g.	

Par ailleurs, on prépare un mélange vitaminique répondant à la composition suivante :

Vitamine B.1	7,5	µg
Vitamine B.2	25	µg
Vitamine PP.	6	µg
Amidon ..... q. s. p.	100	mg

On donne par rat et par jour :

20 g. de régime,
100 mg. du mélange vitaminique ci-dessus,
3 gouttes huile de foie de morue.

Ce régime apporte les glucides, les lipides et les sels minéraux nécessaires pour couvrir les besoins des animaux dans les conditions de l'expérience, mais il renferme des quantités infimes d'azote (0,4 à 0,6 mg. par gramme, selon les préparations).

Nous préparons encore une solution d'acétate de plomb

---

(1) Beurre lavé 7 fois avec 6 à 8 fois son poids d'eau en le faisant fondre à 40° C. Un séjour à la glacière permet ensuite la séparatioin de l'eau de lavage. Ceci élimine la plus grande partie de l'azote contenu dans le beurre.

(2) Melange salin d'osborne renferme (en g.) CINa : 100 ; (PO4) 2Ca3 : (2) Mélange salin d'osborne renferme (en g.) CINa : 100 $(PO_4)_2$ Ca_3 110 citrate de Mg : 60 : KCL 15 ; citrate fer : SO4Mn : 1 ; 1 : 0,5 IK : 0,10.

(CH_3CO_2) Pb. 3 H_2O P.M. 379, à 7,34 g. dans 1 litre d'eau distillée, qui renferme 4 mg. de plomb par ml.

Notre premier essai a porté sur 5 rats ; pendant 7 jours nous avons donné « per os » (donc nous l'avons ajouté au régime) une dose de plomb de l'ordre de 20 mg. de plomb p. K. d'animal. Les 5 rats ayant en moyenne 100 g. nous avons donné à chaque animal 0,5 ml. de solution d'acétate de plomb (soit une dose quotidienne de plomb égale à 2 mg.) ; puis, pendant quatre jours, nous avons détoxiqué l'organisme du rat par une injection de 1 ml. d'une solution à 5 % de versénate double de calcium et de sodium (soit une dose quotidienne de versénate égale à 50 mg) ; enfin, les jours suivants, nous avons étudié les réactions des animaux toujours maintenus à l'inanition protéique.

Cet essai étant réalisé dans le but de nous permettre d'orienter nos travaux ultérieurs, nous nous sommes intéressés uniquement aux variations du poids des animaux et du nombre de leurs hématies.

Nous avons établi une moyenne des résultats obtenus dans le tableau n° VII.

TABLEAU VII

Variation moyenne en fonction du temps, du poids et du nombre des hématies de 5 rats soumis à l'inanition protéique et à 7 jours d'intoxication plombique.

Temps en jours d'inanition protéique	*Dose quotidienne de plomb (en mg.)*	*Versénate double de calcium et sodium injecté (en mg./jour)*	*Poids g.*	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶*
0	0	0	104	8,00
1	2	0		
2	2	0		
3	2	0		
4	2	0		
5	2	0		
6	2	0		
7	2	0		
8	0	50		
9	0	50	104	6,27
10	0	50		5,85
11	0	50		
13	0	0	91	5,97
15	0	0		6,17
17	0	0	84	

D'après l'examen de ce tableau, avant tout traitement, nous notons chez le rat blanc adulte une valeur moyenne de 8 millions d'hématies par mm3. Ceci correspond aux valeurs données par VERMEULEN, chez le rat normal adulte : « le nombre des hématies par mm3 est compris entre 8 et 9 millions ».

Le neuvième jour, on note une valeur moyenne de 6 millions d'hématies par mm3. Cette chute des globules rouges, obtenue en quelques jours, est particulièrement intéressante, d'autant plus qu'elle se maintient à partir du 11e jour, alors que les rats sont uniquement soumis au régime privé de protéines.

De même, le poids des animaux décroît régulièrement si bien que le 17e jour la diminution du poids atteint 20 % du poids initial. Toutefois, le rat n'a pas encore épuisé toutes ses réserves ; il est même assez éloigné du stade physiologique d'épuisement, se situant aux environs d'une perte de poids égale à 40 et 50 % du poids normal à l'âge adulte.

A l'aide des renseignements obtenus, nous avons fixé les modalités des expériences suivantes. Nous avons espéré, en augmentant le temps d'intoxication plombique, obtenir alors une anémie importante chez le rat.

Une première expérience a été réalisée avec 5 rats et une deuxième avec 4.

Nous avons poursuivi l'intoxication plombique pendant quinze jours, cela étant la seule modification aux conditions expérimentales fixées dans notre essai préliminaire.

Nous avons considéré que le poids moyen de nos animaux était proche de 200 g. Nous avons donné à chaque rat 1 ml. de solution d'acétate de plomb (soit une dose quotidienne de plomb égale à 4 mg).

Les moyennes des résultats obtenus sont réunies dans les tableaux n° VIII et VIII bis.

TABLEAU VIII

Variation moyenne en fonction du temps, du poids des animaux, du nombre des hématies, de la concentration en hémoglobine et de la valeur globulaire du sang de 5 rats soumis à l'inanition protéique et à 15 jours d'intoxication plombique.

Temps en jours d'inanition protéique	*Dose quotidienne de plomb (en mg.)*	*Versénate double de calcium et sodium injecté (en mg par pour)*	*Poids en g.*	*Hématies (N) p. mm^3 $N \times 10^6$*	*Hémoglobine p. mm^3 µg*	*Valeur globulaire µµg*	*Observations*
—	—	—	—	—	—	—	
(0	0	0	239	8,02	155	19,3	
1	4	0	227				
2	4	0					
3	4	0	223				
4	4	0					
5	4	0	227				
6	4	0					
7	4	0	211				

8	4	0		7,32	147	20	
9	4	0					
10	4	0	203				
11	4	0					
12	4	0	193	7,04	128	18,2	
13	4	0					
14	4	0					
15	4	0	189	6,07	110	18,1	
16	0	50					
17	0	50					
18	0	50					
19	0	50	180				
20	0	0		4.36	83	19	
23	0	0	183	3,59	71	19,8	
27	0	0	162	4,52	83	18,4	
30	0	0	165	5,00	93	19	1 mort
34	0	0	162	4,66			
37	0	0		3,80	80	21,1	

TABLEAU VIII bis

Variation moyenne en fonction du temps, du poids des animaux, du nombre des hématies, de la concentration en hémoglobine et de la valeur globulaire du sang de 4 rats soumis à l'inanition protéique et à 15 jours d'intoxication plombique.

Temps en jours d'inanition protéique	*Dose quotidienne de plomb (en mg.)*	*Versénate double de calcium et sodium injecté (en mg par jour)*	*Poids en g.*	*Hématies (N) p. mm^3 N × 10^6*	*Hémoglobine p. mm^3 µg*	*Valeur globulaire µg*	*Observations*
—	—	—	—	—	—	—	
0	0	0	237				
1 jour diète							
0	0	0	226	6,97	159	22,8	
1	4	0					
2	4	0					
3	4	0					
4	4	0	222				
5	4	0					
6	4	0	206				

7	4	0					
8	4	0		6,13	145	23,7	
9	4	0					
10	4	0					
11	4	0					
12	4	0					
13	4	0	195				
14	4	0		5,75	113	19,7	
15	4	0					
16	0	50					
17	0	50	186				
18	0	50					
19	0	50		4,39	100	22,8	
20	0	0					
21	0	0	182				
22	0	0		4,59	101	22	
26	0	0		5,61	108	19,3	
27	0	0	171				
30	0	0		5,05	108	21,4	1 mort
33	0	0	157				
35	0	0		3,80	88	23,2	1 mort
39	0	0	152		87,9		

L'examen de ces tableaux nous montre que le poids des animaux décroît régulièrement. Dès le 20e jour, on note une perte de poids de l'ordre de 20 % environ ; cela met l'organisme en état de moindre résistance et permet plus facilement l'établissement du syndrôme anémique.

D'autre part, pendant les 15 jours d'intoxication plombique, on observe une chute du nombre des globules rouges atteignant environ 1 million. Pendant les 4 jours suivants, cette chute s'accentue, si bien que le 20e jour on note une anémie très nette (de l'ordre de 50 % environ dans le premier groupe de 5 animaux et de l'ordre de 40 % environ dans le deuxième groupe de 4 animaux). Toutefois, le taux des globules rouges subit quelques oscillations les jours suivants. Il semble que l'animal mobilise toutes les réserves de son organisme pour lutter contre cet état déficitaire.

De même, le taux d'hémoglobine subit une baisse importante pendant les 15 jours d'intoxication plombique et les 4 jours de détoxication par le versénate. Pendant la période dite de stabilisation, ce taux remonte légèrement puis révèle, comme les numérations globulaires, une anémie à 50 % environ pour le premier lot et 40 % environ pour le deuxième lot.

La valeur globulaire obtenue dans le cas de cette anémie est dans l'ensemble normochrome, avec une légère tendance à devenir hyperchrome.

Ce fait a particulièrement retenu notre attention car nous avons noté, chez quelques animaux, des valeurs inhabituelles. Quelques résultats obtenus pour 3 rats sont réunis dans le tableau **n° IX.**

TABLEAU IX

Valeurs globulaires relevées au cours des expériences précédentes et ne figurant pas dans les moyennes des tableaux VIII et VIII bis.

Animaux N°	*Temps en jours d'inanition protéique*	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶*	*Hémoglobine p. mm³ µg*	*Valeur globulaire µµg*
5	30	2,20	87	39 (?)
5	37	2,20	69	31 (?)
1	39	1,56	70	45 (?)
3	39	2,45	106	43 (?)

De l'examen de ce tableau il ressort que ces valeurs globulaires sont nettement anormales ; nous ne les avons pas fait entrer dans le calcul des moyennes établies dans les tableaux VIII et VIII bis.

Mais il convient de rechercher la cause de ces valeurs globulaires aberrantes. La détermination du taux d'hémoglobine ne peut être entachée d'erreurs. Nous avons noté précédemment la fidélité de notre technique et son application ne peut entraîner de fautes si les manipulations sont soigneusement respectées.

Il semble donc que les numérations globulaires restent seules en cause.

Afin de rechercher l'explication de ce phénomène, nous avons mis en expérience un nouveau groupe d'animaux. Sur un lot de 6 rats, nous avons vérifié plus étroitement nos techniques de dosage. 15 jours d'intoxication plombique n'ayant pas produit, chez nos animaux, un état anémique important, nous avons prolongé jusqu'à 20 jours ce premier temps. Le poids moyen des animaux étant 250 g. nous avons donné à chaque rat :

1,25 ml. de solution d'acétate de plomb (soit une dose quotidienne de plomb égale à 5 mg). Nous avons suivi ensuite les phases expérimentales mises au point précédemment. Les résultats de cette expérience sont réunis dans le tableau n° X.

TABLEAU X

Variation moyenne en fonction du temps, du poids des animaux, du nombre des hématies, de la concentration en hémoglobine et de la valeur globulaire du sang de 6 rats soumis à l'inanition protéique et à 20 jours d'intoxication plombique.

Temps en jours d'inanition protéique	*Dose quotidienne de plomb (en mg.)*	*Versénate double de calcium et sodium injecté (en mg par jour)*	*Poids en g.*	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶*	*Hémoglobine p. mm³ µg*	*Valeur globulaire µµg*	*Observations*
—	—	—	—	—	—	—	
0	0	0	253	8,60	179	20,8	
1 jour de diète							
0	0	0	243				
1	5	0					
2	5	0					
3	5	0	236				
4	5	0					
5	5	0					
6	5	0	223				
7	5	0					

8	5	0		8,20	165	20,1
9	5	0				
10	5	0				
11	5	0				
12	5	0				
13	5	0	213			
14	5	0		7,94	143	18
15	5	0				
16	5	0				
17	5	0	208			
18	5	0				
19	5	0		7,65	131	17,1
20	5	0				
21	0	50	199			
22	0	50				
23	0	50				
24	0	50		6,54	138	21,1
25	0	0				
26	0	0		7,50	128	17,1
27	0	0	188			
30	0	0		7,13	124	17,4
33	0	0	181			
35	0	0		6,05	120	20
39	0	0	171	5,45	130	23,8

D'après l'examen de ce tableau, nous notons (comme dans les tableaux n[os] VIII et VIII bis) une chute régulière du poids des animaux. Toutefois cette chute est moins rapide, les animaux sont plus résistants ; ceci peut expliquer leur moindre réaction aux 15 premiers jours d'intoxication plombique.

Nous observons cet état de défense et de résistance du rat dans les numérations globulaires qui se maintiennent assez élevées dans un temps plus long.

La baisse du taux d'hémoglobine est plus rapide. Dès le 26e jour, ce taux dénote une anémie à 30 % environ.

La valeur globulaire de type normochrome devient légèrement hypochrome alors que l'état anémique s'installe chez les animaux, puis brusquement se trouve être légèrement hyperchrome.

Nous avons repris quelques résultats obtenus pendant cette expérience et traduisant un phénomène assez spectaculaire. En effet, chez des animaux différents, nous avons par hasard attendu un délai de 1 à 2 heures entre la prise de sang effectuée pour la numération globulaire et le comptage des éléments ; le jour même, nous avons pratiqué une nouvelle prise de sang et réalisé le comptage des globules rouges immédiatement.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau n° XI.

TABLEAU XI

Valeurs globulaires obtenues chez un rat, en effectuant la numération globulaire d'une part immédiatement après le prélèvement de sang et, d'autre part une à deux heures après le prélèvement.

Animaux N°	*Temps en jours d'inanition protéique*	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶ Numération globulaire effectuée immédiatement* (a)	*1 à 2 h. après prélèvement* (b)	*Hémoglobine p. mm³ µg*	*Valeur globulaire µg d'après* (a)	(b)
4	35	4,00	0,76	84	21	110 ?
4	39	4,00	1,37	79	19	57 ?
5	35	5,60	0,50	89	15	178 ?
6	39	5,88	0,68	107	18	157 ?

Après examen de ce tableau, nous constatons que les numérations globulaires effectuées 1 à 2 h. après le prélèvement de sang sont très inférieures à celles obtenues avec le même sang, mais

réalisées immédiatement après le prélèvement. Ce nombre d'hématies très diminué conduit alors à des valeurs globulaires qui n'ont plus aucun sens.

Rappelons que les conditions opératoires habituellement observées sont exactement les mêmes. Les globules rouges sont mis en suspension dans du liquide de MARCANO couramment employé en hématologie et renfermés dans une pipette de POTAIN.

Cette disparition des hématies, notée 1 à 2 h. après le prélèvement, est alors la conséquence d'une lyse globulaire.

Brusquement et irrégulièrement, chez nos rats soumis à l'inanition protéique et à l'intoxication plombique, apparaît une grande fragilité globulaire.

Il ne nous a pas été possible d'étudier particulièrement ce phénomène. Mais dès lors, connaissant son existence, il nous permet d'expliquer les valeurs globulaires trop élevées rencontrées dans nos expériences précédentes. De même, nous pouvons admettre que nos résultats précédents renferment des erreurs non évidentes comme celles que nous avons relevées, mais qui peuvent nous avoir orientés vers une interprétation légèrement erronée des réactions déclenchées chez nos rats. En effet, nous ne nous sommes jamais inquiétés du temps écoulé entre nos prélèvements de sang et le comptage des globules rouges.

Afin de poursuivre notre étude, nous avons mis en expérience 10 rats. Mais nous avons opéré de façon à rendre le facteur temps entre le prélèvement et la numération des hématies, tout à fait négligeable. Nous avons suivi les règles expérimentales fixées pour le lot de rats précédents, ainsi nous avons soumis les animaux à 20 jours d'intoxication plombique. Leur poids moyen atteignant 200 g. nous avons donné à chaque animal : 1 ml. de solution d'acétate de plomb (soit une dose quotidienne de plomb égale à 4 mg).

Nos résultats sont réunis dans le tableau n° XII.

TABLEAU XII

Variation moyenne en fonction du temps, du poids des animaux, du nombre des hématies, de la concentration en hémoglobine et de la valeur globulaire du sang de 10 rats soumis à l'inanition protéique et à 20 jours d'intoxication plombique.

Temps en jours d'inanition protéique	*Dose quotidienne de plomb (en mg)*	*Versénate double de calcium et sod.um injecté (en mg par jour)*	*Poids en g.*	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶*	*Hémoglobine p. mm³ µg*	*Valeur globulaire µµg*	*Observations*
—	—	—	—	—	—	—	
0	0	0	199				
1 jour diète							
0	0	0	182	8,00	166	20,8	
1	4	0					
2	4	0					
3	4	0					
4	4	0	182				
5	4	0					
6	4	0					
7	4	0					

8	4	0	171	7,07	146	20,6	
9	4	0					1 mort
10	4	0					
11	4	0					
12	4	0					
13	4	0					
14	4	0	148	7,16	138	19,3	
15	4	0					1 mort
16	4	0					
17	4	0					
18	4	0					
19	4	0	172	6,24	119	19,1	
20	4	0					
21	0	50					
22	0	50					
23	0	50					
24	0	50	150	5,98	120	20,1	
25	0	0					
28	0	0	143	6,06	116	19,1	
31	0	0	139	5,88	103	17,5	
37	0	0	131	6,03	94	15,6	
39	0	0		5,90	91	15,4	

L'examen de ce tableau nous permet de constater une chute réulière du poids des animaux. Le 25e jour apparaît, d'après la numération globulaire, une anémie à 25 % ; cette anémie se maintient pendant un minimum de quinze jours.

Le taux d'hémoglobine décroît et conduit à une valeur globulaire de type normochrome en début d'expérience. Cette valeur globulaire tend à devenir hypochrome alors que l'état anémique s'est installé chez l'animal.

En conclusion, ce protocole expérimental présente deux avantages : 1° Il permet de provoquer une anémie plus rapidement que par l'inanition protéique ; en effet, 20 jours d'intoxication plombique suivis de 4 jours de détoxication par le versénate suffisent pour obtenir une nette anémie.

Rappelons que nous attendons 35 à 40 jours avant l'apparition d'une anémie chez le rat soumis à l'inanition protéique seule.

2° La mortalité est très réduite. Quelques animaux ne s'adaptent pas à ce nouveau régime en début d'expérience. Mais, lorsque l'état anémique est atteint, les animaux présentent un équilibre physiologique suffisant à leur survie. Cet équilibre est tel que nous gardons les rats dans cet état pendant un minimum de 15 jours.

Nous disposons alors d'une longue période particulièrement intéressante qui permet de réaliser de nombreuses études, telles que les tests d'activité de substances données.

Enfin, avec ce protocole expérimental, après traitement par le plomb, nous avons mis en évidence un phénomène de lyse globulaire qu'il serait intéressant d'étudier et de pouvoir interpréter.

II. - ANEMIE PROVOQUEE PAR UNE RESINE ECHANGEUSE D'ANIONS, MELANGEE A UN REGIME COMPLET.

Les examens de laboratoire pratiqués chez un sujet présentant une anémie de Biermer permettent de caractériser cette anémie mégaloblastique. Ainsi l'étude de la sécrétion gastrique dénote une achylie totale et permanente des trois sécrétions :

Acide chlorhydrique, pepsine, lab-ferment.

L'idée de provoquer, à notre tour, des troubles gastriques chez le rat nous a tentés. En effet, on peut penser qu'un animal ayant un estomac rendu achlorhydrique serait conduit vers un état anémique.

Nous avons fixé les modalités expérimentales suivantes : Pour bloquer l'acidité gastrique du rat nous avons pris une résine échangeuse d'anions, soit de l'amberlite IR A 400. Cette résine étant « activée », nous avons recherché la quantité nécessaire pour neutraliser la dose quotidienne d'acide chlorhydrique secrété par l'estomac du rat. 2 à 3 g. de résine sont nécessaires pour conduire à la neutralité.

Il nous restait à mélanger la résine au régime complet dans la proportion de 10 à 15 %.

Comme régime complet, nous avons choisi du totaliment (pour lapins). Afin de connaître la teneur azotée de ce totaliment, nous avons effectué une minéralisation suivie d'un dosage de l'azote selon la technique de PARNASS et WAGNER. Nous avons noté

1,232 g. d'azote pour 100 g. de totaliment

Par rat et par jour nous donnons

20 g. de régime (renfermant 2 à 3 g. de résine, selon les préparations).

Etant donné que chaque animal reçoit un minimum de 17 g. de totaliment, ses dépenses azotées sont largement compensées (la dépense minima azotée par jour et par rat est voisine de 60 mg d'N).

Notre premier essai a été effectué avec 3 rats. Nous leur avons donné le régime complet renfermant 10 % de résine échangeuse d'anions. Nous avons suivi l'évolution de leur poids et de leur nombre d'hématies.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau n° XIII.

TABLEAU XIII

Variation en fonction du temps, du poids et du nombre des hématies d'un rat soumis au régime complet renfermant 10 % de résine échangeuse d'anions (R.A.)

Temps en jours de régime complet renfermant 10 % R.A. (2 g. par rat et par jour)	RAT N° 1		RAT N° 2		RAT N° 3	
	Poids en g.	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶*	*Poids en g.*	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶*	*Poids en g.*	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶*
—	—	—	—	—	—	—
0	130	8,00	190	8,00	115	8,00
7	110		180		130	
8	108		190		132	
12	108		190		140	
14	108		180		128	
15		7,77		7,41		7,78
17	125		185		125	
19	120		180		130	
21	112		175		135	
22	112	2,46	182	8,34	132	7,83
23	108 (mort)	2,52				
24			182		134	
26			184		136	
28			164	6,57	122	8,19
29			170		132	
31			178	7,92	135	6,66
33			172		135	
35			170		135	
38			190	6,12	147	6,00
41			190	5,49	150	6,57

L'examen de ce tableau montre, chez le rat n° 1, une réaction différente de celle des deux autres animaux ; brusquement, ce rat accuse une diminution du nombre de ses globules rouges, de son poids et meurt le 23e jour.

Les rats numéros 2 et 3 résistent à ce nouveau régime. Pendant un mois on ne note aucune variation sensible. A partir du 29e et 31e jour, une légère anémie commence à apparaître. Les globules rouges passent de 8 millions aux environs de 6 millions par millimètres cubes.

Cet état anémique se maintient et le 41e jour, nos animaux sont toujours en vie.

Leur poids atteint le chiffre noté le premier jour et augmente même chez le rat n° 3.

Nous avons recommencé ces expériences avec 12 animaux, en apportant quelques modifications à la technique opératoire. Pendant une semaine, nous les avons soumis au régime protéiprive (décrit précédemment), renfermant une proportion de 10 % de résine échangeuse d'anions. Ce premier temps étant réalisé dans le but de mettre l'organisme des rats en état de moindre résistance. Ensuite, nous leur avons donné le régime complet avec une proportion de 15 % de résine échangeuse d'anions.

Cela nous a semblé être un traitement très fort sachant que l'acidité gastrique de l'animal est ainsi neutralisée.

Les moyennes des résultats obtenus sont rassemblées dans le tableau n° XIV.

TABLEAU XIV

Variation moyenne en fonction du temps, du poids, du nombre des hématies, du taux d'hémoglobine et de la valeur globulaire de 12 rats soumis au régime complet renfermant 15 % de résine échangeuse d'anions (R.A.)

Temps en jours d'inanition protéique + 10 % R.A. (2 g. par rat et par jour)	*Temps en jours de régime complet renfermant 15 % R.A. (3 g. par rat et par jour)*	*Poids en g.*	*Hématies (N) p. mm³ N × 10⁶*	*Hémoglobine p. mm³ µg*	*Valeur globulaire µµg*	*Observations*
—	—	—	—	—	—	—
0	0	169	7,28	147	20,2	
7	0					
	1	146	7,65			
	8	158	6,27			4 morts
	15	155	7,28	129	17,7	
	22	164	6,40			
	29	161	6,40			
	35	176	6,74			1 mort
	43	187	6,18			
	50	196	6,09			
	57	207	6,73	137	20,4	

D'après l'examen de ce tableau, nous observons une mortalité importante les premiers jours de l'expérience. Ce fait semble être la cause du traitement protéiprive auquel est joint la résine échangeuse d'anions, ceci pendant une semaine, perturbe de nombreux processus physiologiques.

Les animaux survivants accusent une chute de leurs globules rouges au cours de cette période. Ensuite, ces animaux présentent une résistance accrue qui se traduit le 15e jour par une numération globulaire semblable à celle effectuée avant la mise en expérience. Le même jour, on effectue le dosage de l'hémoglobine, par contre le taux est nettement diminué. La réaction de l'organisme, reflétée par les variations apparemment inverses du nombre des hématies et de la concentration en hémoglobine, trahit l'établissement d'un syndrôme anémique.

En effet, les jours suivants, les globules rouges se maintiennent aux environs de 6 millions/mm3 ; le taux d'hémoglobine légèrement augmenté est cependant éloigné du taux initial. Donc, nos animaux présentent une légère anémie.

Toutefois, le 57e jour d'expérience, les globules rouges sont toujours aux environs de 6 millions/mm3. Le poids des animaux est même supérieur à celui enregistré au début. Notre protocole expérimental peut paraître conduire à des résultats un peu lentement.

Il faut alors rappeler que chez l'homme de nombreuses années s'écoulent entre les premiers symptômes non décelables d'une maladie de Biermer et l'établissement de l'anémie. De même, expérimentalement, il faut attendre plusieurs années pour créer une anémie chez les animaux (2 ans pour le porc ayant subi l'ablation de l'estomac). Aussi il nous est impossible de créer une telle anémie chez le rat en 1 à 2 mois. Un traitement minimum de 6 mois environ serait certainement nécessaire.

Pour conclure, nous pouvons espérer qu'un travail ainsi conduit sera effectué un jour prochain. L'expérience serait réalisée selon les conditions que nous avons fixées et qui, en l'espace de deux mois, ont déjà modifié l'état des animaux. Elle serait prolongée jusqu'à l'obtention d'une anémie très importante.

Nous pensons qu'une telle anémie expérimentale pourrait être appelée à connaître une application digne d'intérêt dans le domaine de la recherche scientifique.

CONCLUSIONS

Les recherches que nous avons poursuivies n'ont pas toutes abouti à donner une réponse définitive aux questions posées par l'objet de notre travail. Nous pensons cependant que la plupart de nos résultats présentent l'avantage de mettre en évidence certaines des difficultés rencontrées et surtout de souligner les causes d'erreurs que d'autres chercheurs pourront ainsi éviter tout en s'efforçant d'en trouver les meilleurs palliatifs. Enfin, dans le domaine des anémies expérimentales, nous apportons de nombreuses suggestions qui pourront être à la base de recherches beaucoup plus précises.

En ce qui concerne la partie de notre travail consacrée à la recherche d'une microméthode de dosage colorimétrique de l'hémoglobine, nous avons réussi à mettre au point une technique nouvelle. Nous avons montré, au cours de notre introduction, que les différentes méthodes basées sur la spectrophotométrie directe de l'hémoglobine ou de ses dérivés sont certes très séduisantes par leur rapidité d'exécution mais, par contre, sujettes à de très nombreuses causes d'erreurs. Notre expérience personnelle confirme ce point de vue tout au moins en ce qui concerne la méthode de M. VERMEULEN, qui ne donne des résultats corrects qu'autant qu'on l'applique à des sangs de sujets normaux. Nous avons montré que cette technique conduit à des erreurs par excès d'autant plus importantes qu'il s'agit de sangs plus pauvres en hémoglobine.

La mise au point de notre technique, fondée sur un dosage colorimétrique du fer, nous a obligés à étudier les conditions de la minéralisation de la prise d'essai de sang total. Nous avons décrit et justifié le procédé que nous préconisons et qui met en œuvre une destruction de la matière organique par l'acide sulfurique et le perhydrol. Sur le produit de minéralisation, le fer est dosé grâce à la réaction colorée qu'il donne avec l'antipyrine. Les conditions de ce dosage colorimétrique ont été précisées.

En définitive, nous proposons une technique satisfaisante en ce sens qu'elle permet le dosage de l'hémoglobine sur une prise d'essai de 0.05 ml. de sang avec une précision de + ou — 2 %. Les réactifs qu'elle met en œuvre doivent être très purs mais ils sont tous d'une excellente conservation. Nous savons qu'elle n'aura pas la faveur des laboratoires d'analyse médicale car elle est trop longue à exécuter, mais en ce qui concerne les travaux de recherche précis, elle nous paraît allier au mieux la simplicité

à la fidélité et à la précision. Comme telle nous l'avons utilisée pour poursuivre nos recherches personnelles sur les anémies expérimentales.

C'est à la suite de dosages comparatifs pratiqués sur un même sang que nous avons pu montrer, en particulier, que la méthode spectrophotométrique de VERMEULEN conduisait à des erreurs par excès considérables lorsqu'il s'agissait du sang de sujets anémiques.

C'est parce que nous disposions d'une méthode valable de dosage de l'hémoglobinémie que nous avons pu montrer que, au cours d'anémies expérimentales diverses et, en particulier, celle consécutive à l'inanition protéique chez le Rat, les valeurs globulaires doivent être interprétées avec la plus grande circonspection. En effet, nous avons observé que de telles anémies s'accompagnent fréquemment d'une fragilité globulaire capable de fausser la numération des hématies. Celle-ci doit être pratiquée aussitôt après le prélèvement de sang, car dans de nombreux cas nous avons pu observer une hémolyse très importante et rapide au sein du liquide de Marcano : il n'est pas rare de voir ainsi des numérations d'hématies de Rat anémique passer de $4x10^6$ à $1x10^6$ du simple fait d'attendre 2 heures pour effectuer la seconde numération. En pareil cas, le calcul des valeurs globulaires n'a plus aucun sens (V. tableau XI, p. 68).

Ces diverses considérations permettent enfin de trancher le désaccord entre les interprétations des résultats hématologiques fournis d'une part par ASCHKENASY et d'autre part par M. VERMEULEN au sujet de l'anémie provoquée chez le Rat blanc par inanition protéique. L'interprétation correcte est celle d'ASCHKENASY qui conclut à une anémie normo ou hypo-chrome. Quant à M. VERMEULEN, qui concluait à une anémie hyperchrome, il a été induit en erreur par les techniques qu'il a utilisées au cours de ces recherches pour l'établissement des valeurs globulaires. D'une part, sa méthode de dosage de l'hémoglobine était pratiquée dans des conditions où, ainsi que nous l'avons montré, elle conduit à des erreurs par excès ; d'autre part, il ne semble pas qu'il ait systématiquement tenu compte de la fragilité particulière des hématies des animaux anémiques. On peut donc penser que ses numérations ont parfois été entachées d'erreur par défaut. Ainsi s'explique que le calcul ait conduit VERMEULEN à des valeurs globulaires supérieures à la valeur réelle, ce qui a eu pour conséquence de le faire conclure à tort que l'anémie protéiprive serait de caractère hyperchrome.

Nous nous sommes donc attachés à étudier la valeur globulaire chez le Rat blanc anémié par des procédés différents. Cela nous a amenés, par la même occasion, à préciser certaines conditions susceptibles d'anémier nos animaux.

En premier lieu, nous avons repris l'étude de l'anémie obtenue chez le Rat blanc à la suite d'une inanition protéique prolongée. Nous avons constaté que l'on obtient ainsi une anémie normo ou hypochrome qui ne s'installe que très lentement. Aussi bien au

cours de cette longue période a-t-on à déplorer la mort d'un nombre important d'animaux. Le déchet est tel que les survivants ne représentent plus qu'un matériel très réduit pour la poursuite de recherches relatives à l'action anti-anémique de certains médicaments.

Par contre, nous avons évité cette fâcheuse mortalité par les procédés suivants :

Dans une première série d'expériences, l'inanition protéique a été accompagnée, au début, d'une légère intoxication en administrant per os de l'acétate de plomb. On obtient ainsi assez rapidement une anémie hypochrome nette. On supprime alors le plomb et, dans une deuxième période, on procède à une détoxication par le complexon III (acide tetra amino acétique) injecté sous forme de sel double de sodium et de calcium, les animaux étant, par ailleurs, maintenus au régime dépourvu d'azote. Ainsi l'anémie est obtenue plus rapidement ; elle se stabilise assez bien et, fait important, la mortalité chez les animaux en expérience est faible.

Enfin, nous avons étudié un dernier moyen d'obtention d'anémie expérimentale qui a consisté à maintenir les Rats à un régime complet, riche en une résine échangeuse d'anion (Amberlite IRA 400). Nous avons pensé que la résine, en bloquant l'acide chlorhydrique du suc gastrique, permettrait de réaliser un des syndromes les plus caractéristiques de l'anémie pernicieuse de Biermer. Effectivement nous avons pu constater que ce régime provoque lentement une anémie de caractère légèrement hyperchrome, ce qui la rapproche de celle de Biermer. Néanmoins, ce résultat exige des expériences de longue durée.

Bref, nous proposons de réaliser des anémies expérimentales par divers procédés et nous soumettons ainsi différentes suggestions aux expérimentateurs désireux de disposer d'animaux de laboratoire pour d'éventuelles recherches sur la thérapeutique des anémies.

LU et APPROUVE.
Le Président du Jury
Professeur C. DUMAZERT

VU et APPROUVE.
Pour le Doyen
L'Assesseur
Professeur J. DELPHAUT

VU et PERMIS D'IMPRIMER.
AIX, le 25 Mai 1960
Le Recteur
J. BLACHE

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDES (J.-E.) et NORTHUP (D.-W). — *J. Lab. Clin. Méd.*, 1938, *24*, 197.
2. ANTCZAK (K.), CHARASZCZEWSKA (A.) et GROSS (S.). — *Med. Pracy.*, 1955, *6*, 219-26. *Excerpta Med.*, Sect. II, 1956, *9*, 1067.
3. ARDRY (R.) et STORCK (J.). — *Ann. Pharm. Franç.*, 1951, *9*, 171.
4. ARDRY (R.) et STORCK (J.). — *Ann. Biol. Clin.*, (Paris), 1951, *9*, 197.
5. ARNOUX (M.-J.). — *Thèse Pharmacie* (doctorat d'Etat), mai 1939, Marseille, Declume Ed.
6. ARNOUX (M.-J.). — *Bull. Soc. Pharm. Marseille*, bull. trimest., févr. 1952, 21.
7. ASCHKENASY (A.). — *Le Sang*, 1946, *17*, 34.
8. ASCHKENASY (A.). — 2me Congrès International de Biochimie, Paris, 1952 ; Symposium sur la Biochimie de l'hématopoièse, 67.
9. ASCHKENASY (A.) et ASCHKENASY-LELU (P.). — *Arch. Sc. Physiol.*, 1947, *1*, 225.
10. ASCHKENASY (A.), DELMONTE (L.) et EYQUEM (A.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1956, *150*, 474.
11. ASCHKENASY (A.), DELMONTE (L.), GUÉRIN (R.) et GUÉRIN (M.-T.). — *C.R. Acad. Sc.*, 1956, *242*, 2174.
12. ASHFORD (C.-A.). — *Brit. Med. J.*, 1943, 575. *Analyst.*, 69, n° 815, 55 (1944).
13. ATLAS-WERKE AKT. — Ges., 1957, Ger., 955, 909. (DORSH et MAASS inventeurs).
14. BARER (R.) et JOSEPH (S.). — *Quart. J. Microscop. Sci.*, 1955, *96*, 423.
15. BARER (R.) et GAFFNEY (F.-M.). — *Clin. Chim. Acta.*, 1957, *2*, 140.
16. BARNETT (J.-F.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1940, *21*, 22.
17. BELL (G.-H.), CHAMBERS (J.-W.) et WADDELL (M.-B.-R.). — *Biochem. J.*; 1945, *39*, 60.
18. BELL (G.-H.). et MC NAUGHT (M.-L.). — *Lancet*, 1944, *2*, 784.
19. BELLI (R.), BONI (A.) et PANDOLFI (C.). — *Diagnostica Tee. Lab.*, (Napoli), Riv. mensile, 1941, *12*, 337.
20. BENEZE (B.). — *Z. Anal. Chem.*, 1948, *128*, 179.
21. BENIGNI (R.). — *Biochim. Terap. Sper.*, 1939, *26*, 397.
22. BERKA (I). — *Pracovni Lekerstvi.*, 1957, 9, 301 - 4.
22bis BERKA (I.). — *Acta. Med. Scand.*, 1957, *157*, 129.
23. BERMANN. — *Jowrn. Biolog. Chemi.*, 1918, *35*, 231.
24. BETKE (K.) et SAVELSBERG (W.). — *Biochem. Z.*, 320, 431. *Klin. Wochschr.*, 1950, *28*, 482.
26. BONATI (F.) et CHIARONI (T.). — *Ateneo Farmense*, 1955, *26*, 40.
26. BONATI (F.) et CHIARONI (T.). — *Ateneo Farmese*, 1955, *26*, 40.
27. BRANLY (E.-E.-D.). — *Thèse Médecine*, Paris, 1882.
28. BRÜCKNER (J.). — *Schweiz. Med. Wochschr.*, 1956, *86*, 1057

29. Brückner (J.). et Desmond (F.-B.). — *Clin. Chim. Acta.*, 1958, *3*, 173.
30. Bucciardi (G.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1936, *11*, 316.
31. Bürker (K.). — *Münch. Med. Wochschr.*, 1934, *81*, 1815.
32. Cannan (R.-K.). — *Am. J. Med. Technol.*, 1958, *24*, 247.
33. Cannan (R.-K.). — *Clin. Chem.*, 1958, *4*, 246.
34. Cannan (R.-K.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1958, *52*, 471.
35. Cannan (R.-K.). — *Science*, 1958, *127*, 1376.
36. Cannan (R.-K.). — *U.S. Armed Forces Med. J.*, 1958, *9*, 683.
37. Cohen (H.). et Barnard (R.-D.). — *Am. J. Clin. Path., Tech. Sect.*, 1946, *10*, 134.
38. Cohen (B.). et Smith (A.-H.). — *J. Biol. Chem.*, 1919, *39*, 489.
39. Coombs (H.-I.). — *Biochem. J.*, 1936, *30*, 1588.
40. Delmonte (L.). — *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1957.
41. Dembo (A.-G.). et Tikhvinskii (S.-B.). — *Laboratornoe Delo 3*, 1957, *N° 3*, 3.
42. Dobeln (W.-V.) et Pircher (L.). — *Helv Physiol. et Pharmacol. Acta.*, 1952, *10*, C 12 (in german).
43. Dognon (A.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1938, *129*, 467.
44. Dognon (A.). et Simonot (Y.). — *Sang*, 1944-45, *16*, 312. *Chimie et Industrie*, 1945, *53*, 34.
45. Dominici (G.). — *Archivio per le Scienze Mediche*, 1929, *53*.
46. Donaldson (R.), Sisson (R.-B.)., King (E.-J.)., Wootton (I.-D.-P.) et Mac Farlane (R.-G.). — *Lancet*, 1951, *260*, 874.
47. Drabkin (D.-L.). — *J. Optical Soc. Am.*, 1941, *31*, 70.
48. Drabkin (D.-L.). et Austin (J.-H.). — *J. Biol. Chem.*, 1935, *112*, 51.
49. Duffie (D.-H.). — *J. Am. Med. Assoc.*, 1944, *126*, 95.
50. Duffie (D.-H.). — *Am. J. Clin. Path., Tech. Sect.*, 1945, *9*, 27.
51. Fleury (P.), Courtois (J.) et Garrido (M.-A.). — *Ann. Biol. Clin.* (Paris), 1949, *7*, 121.
52. Fleury (P.) et Marque (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, *11*, 1, 123.
53. Fontes (G.) et Thivolle (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, *3*, 23.
54. Fontes (G.) et Thivolle (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, *4*, 614.
55. Fontes (G.) et Thivolle (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, *5*, 325 et 782.
56. Fourcade (J.). — *Thèse Pharmacie*, Montpellier, 1936, 254.
57. Gaensler (E.-A.), Cadigan (J.-B.), Ellicott (M.-F.), Jones (R.-H.) et Marks (A.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1957, *49*, 945.
58. Garcia-Blanco (J.) et Grisolia (J.). — *Anales Inst. Med. Exptl.*, Valencia, 1945, *3*, 171. *Chimie et Industrie*, 1946, *56*, 211.
59. Gayte-Sorbier (A.). — *Thèse Pharmacie* (doctorat d'Etat), fév. 1959, Marseille.
60. Giacomo (P.), Guillot (M.) et Jacquinot (P.). — *Compt. Rend.*, 1956, *243*, 985.
61. Giordano (A.-J.). — *Am. J. Clin. Path. Tech. Suppl.*, 1938, *2*, 103.
62. Giubileo (M.). — *Med. Lavoro*, 1958, *49*, 530.
63. Gladishevs'Ka (T.-M.)., Kvyatkivs'Ka (Y.-S.) et Sobchuk (B.-A.). — *Ukrain. Biokhim. Zhur.*, 1957, *29*, 371 (Russian Summary).
64. Grehant. — *Comptes Rendus*, 1872, *75*.
65. Guyton (A.-C.), Ritter (R.-M.), et Satterfield (J.-H.). — *Rev. Sci. Instr.*, 1952, *23*, 639.
66. Haberli (E.). — *Experientia*, 1954, *10*, 34 (in german).
67. Haden (R.-L.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1939, *25*, 325.
68. Haldane (J.). — *J. of Physiol.*, 1900, *25*, 295, 1 figure.
69. Haldane (J.-S.), — *J. Path. Bact.*, 1921, *23*, 443.
70. Hall (F.-G.). — *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 1935, *51*, 289.
71. Hallion et Borrien. — *Comptes Rendus de la Société d'Hématologie, Sang*, 1934, *8*, 224.

72. Havemann (R.). — *Klin. Wochschr.*, 1940, *19*, 503.
73. Havemann (R.), Jung (F.) et Von Issekutz (B.). — *Biochem. Z.*, 1939, *301*, 116.
74. Havemann (R.) et Mahling (A.). — *Folia Hematol.*, 1958, *75*, 411.
75. Hayem. — Société de Biologie, 1877.
76. Heilmeyer (L.) et Von Mutius (I.). — *Deut. Arch. Klin. Med.*, 1938, *182*, 164.
77. Henocque. — Aide-Mémoire Léauté.
78. Henry (R.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1945, *3*, 26. *Chimie et Industrie*, 1946, *55*, 110.
79. Hill (R.). — *Proc. Roy. Soc.*, 1930, B., *107*, 205.
80. Hoppe-Seyler (F.). — Traité d'Analyse Chimique appliquée à la Physiologie, Paris, 1877.
81. Hynes (M.) et Lehmann (H.). — *J. Physiol.*, 1946, *104*, 305.
82. Iokhel'son. — *J. Physiol.* (U.R.S.S.), 1937, *22*, 236.
83. Issekutz (B.). — Math. Naturw. Anz. Ungar. Akad. Wiss., 1941, *60*, 217.
84. Jolyet et Laffont. — Société de Biologie, 1877.
85. Jonxis (J.-H.-P.). — *Nederland. Tidjschr. Geneeskunde*, 1939, 83. 1, 876.
86. Kathen (H.). — *Biochem. Z.*, 1954, *325*, 491.
87. Kennedy (R.-P.). — *Am. J. Physiol.*, 1926, *78*, 56.
88. Khalifa (A.-A.) et Salah (M.-K.). — *Nature*, 1951, *168*, 915.
89. Kimura (E.). — *Bunko Kenkyn*, 1957, *6*, n° 3, 21.
90. King (E.-J.) et Gilchrist (M.). — *Lancet*, 1947, *253*, 201. *Chem. Rentr.*, 1948, *1*, 221.
91. Klisiecki (A.). — *Acta. Physiol. Polon.*, 1956, *7*, 229.
92. Knecht et Hibbert. — Longmans Green and C°, 1910.
93. Koransky (W.). — *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 1952, *215*, 483.
94. Kous (J.-C.), Jouvenas (G.-H.) et Wadman (J.-K.). — *Ned. Tidjschr., Geneeskunde*, 1955, 99, IV, 2983.
95. Koziro Matuda. — *Japan J. Med. Sci., VIII Internal. Med., Pediat. Psychiat.*, 5, Proc. 28-9, 1938.
96. Kreuzer (F.). — *Experientia*, 1957, *13*, 300 (in english).
97. Kropachev (V.-A.). — *Laboratornoe Delo 3*, 1957, n° 3, 9
98. Krosch (H.). et Heidelmann. — *Klin. Woschschr.*, 1955, *33*, 947.
99. Kugelmass. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, *4*, 577.
100. Leffingwell (T.-P.), Melville (G.-S.). Riess (R.-W.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1958, *53*, 622.
101. Lesser. — *Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt.*, 1878.
102. Lundsgaard (C.) et Moller (E.). — *J. Biol. Chem*, 1922, *52*, 377.
103. Mac Laine (P.-L.) et Pastorius (G.-J.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1941, *26*, 1054.
104. Malassez. — *Arch. de Physiologie*, 1877.
105. Malassez. — *Arch. de Physiologie*, 1882.
106. Marangoni (P.) — *Arch. Sci. Biol.*, 1942, *28*, 65. *Chem. Zentr.*, 1942, *2*, 1495.
107. Marenzi (A.-D.) et Lida (E.). — *Anales Farm. Bioquim.* (Buenos Aires), 1939, *10*, 12.
108. Markuze (Z.). — *Roczniki Panstwowego Zaktadu Hig.*, 1950, *1*, 340.
109. Marques Mendes Coutinho (H.). — *Rev. Quim. e Farm.*, Rio de Janeiro, 1951, *16*, 155.
110. Martinelli (M.) et Turchetto (E.). — *Farmaco Ed. Sci.*, 1956, *11*, 213.
111. Mesinev (M.-J.). — *Lab. Prakt.* (U.R.S.S.), 1941, *16*, n° 5, 10.
112. Meyer-Wilmes (J.) et Remmer (H.). — *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 1956, *229*, 441.

113. MIMURO (K.). — *M.tt. Med. Ges. Tokio*, 1935, *49*, 356. *Physiol. Abstracts, 20*, 735.
114. MOREAU (B.). — *Thèse Médecine*, Lyon, 1901.
115. MOUREU (H.), CHOVIN (P.), TRUFFERT (L.) et LEBBE (J.). — *Congr. Groupe. d'Avance Méthodes Anal. Spectrog. Prod. Met.*, 19th Congr., 1956, 235.
116. MOUREU (H.), CHOVIN (P.), TRUFFERT (L.) et LEBBE (J.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1957, 1155. *Chim. Anal.*, 1957, *39*, 3.
117. MOUSSERON (M.) et CROS (M^lle). — *Bull. Soc. Chim.*, 1930, 4^me série, 783.
118. NAHAS (G.-G.). — *Science*, 1951, *113*, 723.
119. NAHAS (G.-G.). — *J. Physiol.* (Paris), 1955, *47*, 867.
120. NAHAS (G.-G.). — *J. Appl. Physiol.*, 1958, *13*, 147.
121. NAKAI (S.). — *Tohoku J. Exptl. Med.*, 1955, *63*, 51.
122. NESTORESCU (B.) et ROVENTA (A.). — *Igiena*, 1959, *8*, 165 (Bucharest).
123. NEUMANN (A.). — *Arch. f. Anat. u. Physiol., Phys ol. Abteil.*, 1902.
124. NEUMANN (A.). — *Zeitscher. f. Physiol. Chem.*, 1902, *37*, 120.
125. NEWCOMER (H.-S.). — *J. Biol. Chem.*, 1919, *37*, 465.
126. NICLOUX (M.). — *Soc. de Biologie*, 1914, *75*, 57.
127. NICOL (B.-M.). — *West African Med. J.*, 1956, *5*, 157. *Nutrition Abstr. et Revs.*, 27, Abstr. n° 2989, 1957.
128. NIEDERHAUSERN (DE) (A.) et FERRARINI (E.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1937, *12*, 229.
129. NIEMI (M.). — *Acta. Anat.*, 1958, 35, suppl., 34, 92 pp.
130. NIZET (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, *28*, 527.
131. NIZET (A.). — Recherches sur la nutrition et la régénération des hématies. Vaillant, Carmanne, Ed. Liège, 1951.
132. OKAMOTO (J.). — *Igaku to Seibutsugaku*, 1956, *40*, 115.
133. PALMER (W.-W.). — *J. Biol. Chem.*, 1918, *33*, 119.
134. PALMIERI (A.) et GIACCA (S.). — *Arch. "E. Maragliano" Patol. e Clin.*, 1956, *12*, 1123.
135. PATRICK (R.-T.), SAARI (J.-M.), POSSATI (S.) et FAULCONER (A.). — Ibid., 1954, *15*, 95.
136. PAUL (W.). — *Trans. on Med. Electrons P.G.M.E.*, 1958, *11*, 34.
137. PAULAIS (R.). — *Compt. Rend.*, 1938, *206*, 783.
138. PETERS (J.-T.). — *Southern Med. J.*, 1947, *40*, 924.
139. PETERSON (S.-M.) et SRANGEWAYS (D.-H.). — *Brit. Med. J.*, 1944, *1*, 43.
140. PHILIPSEN (M.). — *U.S.*, 2, 163, 467, june 20.
141. PHILIPSEN (M.). — *Ger.* 718, 400, feb. 19, 1942.
142. PHILLIPS (R.), VAN SLYKE (D.-D.), DOLE (V.-P.), EMERSON (K.-I.), HAMILTON (P.-B.) et ARCHBALD (R.-M.). — New-York U.S. Navy Research Unit Hosp. of the Rockfeller Inst. for Medical Research (C.A., 1943, 6297, 2).
143. PHILLIPS (R.-A.), VAN SLYKE (D.-D.), HAMILTON (P.-B.), DOLE (V.-P.), EMERSON (K.), ARCHIBALD (R.-M.) et STANLEY (E.-G.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, *183*, 305.
144. PIETTE (M.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1945, *139*, 653.
145. PIIPER (J.). — *Beitr. Sil kose Forsch.*, 1956, *45*, 43.
146. POLI (E.). — *Diagnost.ca Tec. Lab.* (Napoli), Riv. mensile, 1940, *11*, 1.
147. POPOV (V.-V.), SOBCHUK (B.-A.). — *Laboratornoe Delo 3*, 1957, *3*, 19.
148. PREYER. — De haemoglobino observationes et experimenta. *Diss. Bonn.*, 1866.
149. QUINCKE. — *Berlin Klin. Wochensch.*, 1878.
150. RAMSAY (W.-N.-M.). — *Biochem. J.*, 1944, *38*, 467.
151. RAMSAY (W.-N.-M.). — *Biochem. J.*, 1953, *53*, 227.

152. Ramsay (W.-N.-M.). — *Clin. Chim. Acta.*, 1957, *2*, 214.
153. Refsum (H.-E.). — *Scand. J. Clin. et Lab. Invest.*, 1957, *9*, 190.
154. Reiter (M.). — *Arch. Exptl. Path. Pharmakol.*, 1950, *210*, 36.
155. Rodrigo (F.-A.). — *Am. Heart. J.*, 1953, *45*, 809.
156. Rostoski et Crecelius. — *Münch. Mediz. Woch.*, 1927, *74*, 330.
157. Roughton (F.-J.-W.) et Scholander (P.-F.). — *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 1942, *24*, 218.
158. Roughton (F.-J.-W.) et Scholander (P.-F.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, *148*, 541.
159. Rusznyak (I.) et Hatz (E.-B.). — *Biochem. Z.*, 1935, *280*, 242.
160. Sacerdote (E.). — *Atti Accad. Lincei*, classe Sci. Fis. Mat. Nat., 1937, *26*, 116.
161. Saint-Martin (de) (L.-G.). — Dosage de l'hémoglobine au moyen du spectrophotomètre. Doin Ed., Paris, 1898.
162. Saint-Martin (de) (L.-G.). — *Quatrième Congrès International de Physiologie*, Cambridge, 1900.
163. Salome-Pereira (R.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, *137*, 417.
164. Salome-Pereira (R.). — *Rev. Brasil. Biol.*, 1943, *3*, 29.
165. Saywell (L.-G.) et Cunningham (B.-B.). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1937, *9*, 67.
166. Schartum-Hansen (H.). — *Folia Hæmatol.*, 1935, *54*, 22.
167. Schnappauf (Hp.). — *Zentr. Veterinärmed.*, 1958, *5*, 109.
168. Scholander (P.-F.), Flemister (S.-C.). et Irving (L.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, *169*, 173.
169. Schroeder (W.-A.), Kay (L.-M.) et Wells (I.-C.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, *187*, 221.
170. Schutzemberger et Rissler. — *Bull. Soc. Chim.*, 1873, *20*.
171. Schwarzenbach (G.). — *Die Komplexometrische Titration*, Stuttgart F. Enke, 1955.
172. Sinohara (K.). — *J. Biochem.* (Japan), 1939, *29*, 57
173. Smith et Cook. — *Analyst.*, 1926, *51*, 503.
174. Soprunov (F.-F.), Babaeva (A.-Kh.). — *Voprosy Med. Khim.*, 1956, *2*, 452.
175. Stadie (W.-C.). — *J. Biol. Chem.*, 1920, *41*, 237.
176. Stefanovskaya (N.-V.). — *Irvest. Akad. Nauk. Turkman S.S.R.*, 1959, *1*, 128.
177. Stovall (W.-D.). — *Modern Hospital*, 1938, *50*, 84.
178. Tallquist. — *Zeitschrift f. Klin. Medicin.*, 1900, *40*.
179. Tallquist. — *Archives Gén. de Médecine*, 1900, *3*, nouvelle serie.
180. Thorp (R.-H.). — *Biochem. J.*, 1941, *35*, 672.
181. Turner (A.). — *Bull. U.S. Army Med. Dept.*, 1946, *5*, 605.
182. Tysarowski (W.) et Kwiek (S.). — *Acta Biochim. Polon.*, 1956, *3*, 55.
183. Van Slyke (D.-D.). — *J. Biol. Chem.*, 1917, *30*, 347.
184. Van Slyke (D.-D.). — *J. Biol. Chem.*, 1927, *73*, 121.
185. Van Slyke (D.-D.). Dillon (R.-T.-W.) et Margaria (R.). — *J. Biol. Chem.*, 1934, *105*, 571.
186. Van Slyke (D.-D.) et Hiller (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1928, *78*, 807.
187. Van Slyke (D.-D.), Hiller (A.), Weisiger (J.-R.), Cruz (W.-O.) et Plazin (J.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, *166*, 121.
188. Van Slyke (D.-D.), Neill (J.-M.) et Harington (C.-R.). — *J. Biol. Chem.*, 1924, *61*, 523.
189. Van Slyke (D.-D.), Phillips (R.), Dole (V.). Hamilton (P.), Archibald (R.) et Plazin (J.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, *183*, 349.
190. Vermeulen (M.). — *Bull. Soc. Pharm.* Marseille, 1953, *5*, 33.
191. Vermeulen (M.). — *Thèse Pharmacie*, 1953, Marseille.
192. Vickery (H.-B.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, *144*, 719.

193. Vierordt (K.). — Tübingen, 1876.
194. Vishnyakov (A.-P.). et Kogan (M.-K.). — *Klin. Med.*, (U.R.S.S.), 1950, 28, n° 1, 88. *Chem. Zentr.*, 1950, *2*, 1267.
195. Vojir (V.). — *Chem. Listy*, 1953, *47*, 1233.
196. Volmar (Y.) et Wagner (A.). — *J. Pharm. Chim.*, 1939, *30*, 364.
197. Vonesch (E.-E.). — *Anales Farm. Bioquim.*, (Buenos Aires), 1939, *10*, 124.
198. Vonesch (E.-E.). — *Anales Farm. Bioquim.*, (Buenos Aires), 1940, *11*, 1.
199. Weise (W.). — *Biochem. Z.*, 1937, *293*, 64.
200. Welch (K.) et Walther (W.-W.). — *Lancet*, 1951, *260*, 548.
201. Welcker. — *Vierteljahrssch. f. d. Prakt. Heilkunde*, 1854, *44*.
202. White (F.-D.). Delory (G.-E.), Christie (K.-A.) et Dudley (E.-A.). — *Can. J. Med. Sci*, 1952, *30*, 136.
203. Williamson (C.-S.). — *Arch. Int. Med.*, 1916, *18*, 505.
204. Wong (S.-Y.). — *Journ. Biol. Chem*, 1923, *55*, 421.
205. Wong (S.-Y.). — *J. Biol. Chem.*, 1928, *77*, 409.
206. Wootton (I.-D.-P.). — *Biochem. J.*, 1958, *68*, 197.
207. Wu (H.). — *J. Biochem.* (Japan), 1922, *2*, 173.
208. Wu (H.). — *J. Biochem.* (Japan), 1923, *2*, 181.
209. Yoe (J.-H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1932, *54*, 4139.
210. Yoe (J.-H.). et Hall (R.-T.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1937, *59*, 872.
211. Zijlstra (W.-G.). — *Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc.*, 1953, *56* C, 598.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 15

SUR LES METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

I - Méthodes chromoscopiques 17

II - Méthodes colorimétriques et spectrophotométriques 18

III - Méthodes spectroscopiques 24

IV - Méthodes gazométriques 25

V - Méthodes chimiques basées sur le dosage du fer 27

DISCUSSION SUR LA VALEUR DE CERTAINES METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE AU COURS DES ANEMIES EXPERIMENTALES 33

OBJET DU TRAVAIL 39

RECHERCHES PERSONNELLES 41

PREMIERE PARTIE : **Mise au point d'un dosage de l'hémoglobine, par la détermination du fer total sanguin** 41

A) Dosage du fer en solution pure 41

B) Dosage de l'hémoglobine dans le sang par la détermination du fer total sanguin 45

DEUXIEME PARTIE : **Etude comparée du dosage de l'hémoglobine dans le sang total** (d'après la méthode spectrophotométrique de VERMEULEN et la méthode ferrométrique que nous proposons) 51

TROISIEME PARTIE : **Sur la détermination de la valeur globulaire chez le rat blanc anémié** 55

I) Anémie provoquée simultanément par inanition protéique et une légère intoxication plombique 57

II) Anémie provoquée par une résine échangeuse d'anions, mélangée à un régime complet 72

CONCLUSIONS 79

BIBLIOGRAPHIE 83

IMPRIMERIE
LINO - IMP.
MARSEILLE
TÉL. : 77-92-48